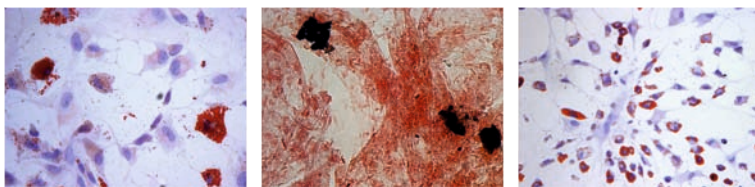


Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks aus Osteoporose-Modellen der Ratte

JULIA GOERGEN



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer/in: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold, Prof. Dr. Sabine Wensch

Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks aus Osteoporose-Modellen der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Julia Goergen

Tierärztin aus Sankt Wendel

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Prof. Dr. Sabine Wensch

Tag der Disputation: 2. April 2014

MEINEN ELTERN UND GROßELTERN

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	9
2 Literaturübersicht	12
2.1 Osteoporose	12
2.1.1 Risikofaktoren für Osteoporose	13
2.1.2 Klinik der Osteoporose	14
2.1.3 Pathophysiologie der Osteoporose.....	14
2.1.3.1 Der Zyklus des Bone Remodeling	15
2.1.3.2 „Bone Remodeling“ und Osteoporose	16
2.1.3.3 Der Einfluss von Östrogen auf den Knochenstoffwechsel	17
2.1.3.4 Die postmenopausale Osteoporose	18
2.1.3.5 Die Glucocorticoid-induzierte Osteoporose	19
2.2 Tiermodelle für Osteoporose	20
2.2.1 Die ovariectomisierte Ratte als Modell für Osteoporose	21
2.2.2 Kombinationen verschiedener Induktionsmethoden bei der Ratte	24
2.3 Mesenchymale Stammzellen	24
2.3.1 Kriterien für MSC in in-vitro Studien.....	26
2.3.2 Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in-vitro	27
2.3.2.1 Differenzierung von MSC zu Osteoblasten in vitro: Die osteogene Differenzierung	27
2.3.2.2 Die adipogene Differenzierung.....	29
2.3.2.3 Die chondrogene Differenzierung	29
2.3.3 Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks im Zusammenhang mit Osteoporose.....	29
2.3.3.1 Veränderungen im Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen osteoporotischer Spender	30
2.3.3.2 Änderungen der Selbsterneuerungskapazität beziehungsweise des Proliferationspotentials mesenchymaler Stammzellen osteoporotischer Spender	31
2.3.3.3 Osteoporose und zelluläre Seneszenz	31
2.3.4 Charakterisierung MSC des Knochenmarks aus Tiermodellen für Osteoporose.....	32
2.3.4.1 Charakterisierung MSC aus Tiermodellen für Seneszenz	32
2.3.4.2 Charakterisierung MSC aus Tiermodellen für Osteoporose... ..	33
2.3.4.3 Vergleich MSC des Menschen mit MSC aus Tiermodellen... ..	34
3 Material und Methoden.....	35
3.1 Material.....	35

3.1.1	Probenmaterial	35
3.1.2	Das Tiermodell.....	35
3.1.3	Verwendete Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	36
3.1.4	Verwendete Reagenzien für histologische Färbungen.....	37
3.1.5	Verwendete Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen	38
3.1.6	Verbrauchsmaterialien	38
3.1.7	Geräte.....	39
3.1.8	Software	40
3.2	Methoden	41
3.2.1	Zellkultur.....	41
3.2.1.1	Isolierung der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark.....	41
3.2.1.2	Kultivierung und Subkultivierung der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark.....	42
3.2.1.3	Kryokonservierung der MSC.....	42
3.2.1.4	Auftauen der MSC	43
3.2.1.5	Osteogene Differenzierung	43
3.2.1.5.1	Vorversuche zur osteogenen Differenzierung: Ermittlung der geeigneten Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums für die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark der Ratte	43
3.2.1.5.2	Durchführung der osteogenen Differenzierung	44
3.2.1.5.3	Messung des Calcium-Gehaltes der Kulturen	44
3.2.1.5.4	Herstellung von Zelllysaten mit peqGOLD TriFast™ für die spätere RNA-Isolierung	45
3.2.1.6	Adipogene Differenzierung	45
3.2.1.7	MTT Test	46
3.2.1.8	Migration	47
3.2.2	Histologische Färbungen	48
3.2.2.1	Von Kossa Färbung	48
3.2.2.2	Oil Red O Färbung.....	49
3.2.2.3	Phalloidin Färbung.....	50
3.2.3	Molekularbiologische Untersuchungen	51
3.2.3.1	RNA Extraktion	51
3.2.3.2	cDNA-Synthese: Qualitative Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR).....	51
3.2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	53
3.2.3.4	Gelelektrophorese	54
3.2.3.5	Quantitative realtime PCR	55
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Morphologie der MSC	57
4.1.1	Morphologie der MSC der Ratten nach drei Monaten Standzeit...	57

4.1.2	Morphologie der MSC der Ratten nach 12 Monaten Standzeit.....	59
4.2	Expression der Oberflächenmarker CD90 und CD105	61
4.3	Osteogene Differenzierung	62
4.3.1	Ergebnisse der Vorversuche zur osteogenen Differenzierung: Ermittlung der geeigneten Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums.....	62
4.3.2	Osteogene Differenzierung: MSC der Ratten nach drei Monaten Standzeit.....	63
4.3.2.1	Von Kossa Färbung	64
4.3.2.2	Messung des Calcium-Gehaltes.....	65
4.3.2.3	Molekularbiologische Ergebnisse: Expression osteogener Differenzierungsmarker	67
4.3.3	Osteogene Differenzierung: MSC der Ratten nach 12 Monaten Standzeit.....	69
4.3.3.1	Von Kossa Färbung	69
4.3.3.2	Messung des Calcium-Gehaltes.....	70
4.3.3.3	Molekularbiologische Ergebnisse: Expression osteogener Differenzierungsmarker	72
4.4	Die Adipogene Differenzierung.....	74
4.5	Die Proliferationskapazität der Zellen: Ergebnisse des MTT Test.....	75
4.5.1	Ergebnisse des MTT Test: Standzeit 3 Monate	75
4.5.2	Ergebnisse des MTT Test: Standzeit 12 Monate	76
4.6	Die Migrationskapazität.....	77
4.6.1	Migrationskapazität: Standzeit 3 Monate	78
4.6.2	Migrationskapazität: Standzeit 12 Monate	80
4.7	Statistische Ergebnisse.....	82
4.7.1	Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse.....	82
4.7.2	Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse	83
4.7.3	Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse	84
5	Diskussion	87
5.1	Diskussion der Methode	87
5.1.1	Das Tiermodell.....	87
5.1.2	Isolierung und Kultivierung der MSC	88
5.2	Die Morphologie der isolierten MSC	89
5.3	Die Proliferationskapazität der MSC.....	93
5.4	Die Migrationskapazität der MSC	95
5.5	Das osteogene Differenzierungspotential	96
5.5.1	Die Methode zur Überprüfung des osteogenen Differenzierungspotential	96
5.5.2	Die Ergebnisse zum osteogenen Differenzierungspotential	98

5.5.2.1	Das osteogene Differenzierungspotential der MSC nach drei Monaten Standzeit	98
5.5.2.2	Das osteogene Differenzierungspotential der MSC nach zwölf Monaten Standzeit	100
5.5.3	Diskussion der Ergebnisse im Vergleich zu humanen MSC osteoporotischer Spender	101
6	Zusammenfassung	103
7	Summary.....	105
8	Literaturverzeichnis	107
9	Anhang.....	121
9.1	Überprüfung des PCR Produktes in der Agar Gelelektrophorese	121
9.2	Publikationen	123

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Tiermodell	36
Abbildung 2: Nativaufnahme: Morphologie der MSC (3 Monate Standzeit)	58
Abbildung 3: Oil Red O Färbung undifferenzierter MSC (3 Monate Standzeit)	58
Abbildung 4: Phalloidin färbung (3 Monate Standzeit)	59
Abbildung 5: Nativaufnahme: Morphologie der MSC (12 Monate Standzeit)	60
Abbildung 6: Oil Red O Färbung undifferenzierter MSC (12 Monate Standzeit)	60
Abbildung 7: Gelelektrophorese: CD90 und CD105.....	61
Abbildung 8: Vorversuche zur osteogenen Differenzierung: Ermittlung der geeigneten Zusammensetzung des Differenzierungsmediums	63
Abbildung 9: Von Kossa Färbung (3 Monate Standzeit)	65
Abbildung 10: Calcium Messung nach osteogener Differenzierung (Standzeit 3 Monate).....	67
Abbildung 11: Expression osteogener Differenzierungsmarker (Standzeit 3 Monate).....	68
Abbildung 12: Expression osteogener Differenzierungsmarker nach 7-tägiger osteogener Stimulation (3 Monate Standzeit).....	69
Abbildung 13: Von Kossa Färbung (12 Monate Standzeit)	70
Abbildung 14: Expression osteogener Differenzierungsmarker (Standzeit 12 Monate).....	73
Abbildung 15: Adipogene Differenzierung: Oil Red O Färbung (Standzeit 3 und 12 Monate).....	74
Abbildung 16: MTT Test (Standzeit 3 Monate)	75
Abbildung 17: MTT Test (Standzeit 12 Monate)	77
Abbildung 18: Nativaufnahmen des Life-Cell Imaging (Standzeit 3 Monate)	78
Abbildung 19: Migrationskapazität (Standzeit 3 Monate)	79
Abbildung 20: Migrationskapazität (Standzeit 12 Monate)	81
Abbildung 21: Signifikanz-Level der Expression RUNX2 undifferenzierter MSC (Standzeit 3 Monate)	85
Abbildung 22: Signifikanz-Level für die Osteocalcin-Expression osteogen differenzierter MSC (Standzeit 12 Monate)	86
Abbildung 23: PCR-Produkte Gapdh, ALP, BSP, OC, RUNX2.....	121

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorversuche zur osteogenen Differenzierung: Getestete Differenzierungsmedien.....	44
Tabelle 2: Mastermix DNase Verdau.....	52
Tabelle 3: Mastermix RT-PCR	52
Tabelle 4: Primersequenz Gapdh	53
Tabelle 5: Mastermix PCR.....	54
Tabelle 6: Primer qRT- PCR.....	56
Tabelle 7: Mastermix qRT-PCR	56
Tabelle 8: Calcium Messwerte (Standzeit 3 Monate)	66
Tabelle 9: Calcium Messwerte (Standzeit 12 Monate)	71
Tabelle 10: Calcium Messung Medium-Überstand und Zell-Lysat.....	71
Tabelle 11: Proliferationsfaktor (Standzeit 3 Monate).....	76
Tabelle 12: Proliferationsfaktor (Standzeit 12 Monate).....	77
Tabelle 13: b-Werte für die Migrationsgeschwindigkeit (Standzeit 3 Monate) ...	80
Tabelle 14: b-Werte für die Migrationsgeschwindigkeit (Standzeit 12 Monate).....	81
Tabelle 15: p-Werte der dreifaktoriellen Varianzanalyse	82
Tabelle 16: p-Werte der zweifaktoriellen Varianzanalyse	83
Tabelle 17: Tukey-Test RUNX2 NC (Standzeit 3 Monate).....	84
Tabelle 18: Tukey-Test OC OD (Standzeit 12 Monate)	85

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ALP	Alkalische Phosphatase
Alpha MEM	Alpha Minimal Essential Medium
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest	Destilliertes Wasser
BMP-2	engl. Bone Morphogenetic Protein 2
BMUs	Basic multicellular units
bp	Base pairs (Basenpaare)
BSP	Bone Sialoprotein
cDNA	Copy DNA
CO₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FBS	Fetales Bovines Serum
G	Gauche
g	Mittlere Erdschwerebeschleunigung
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HET	Hormonersatztherapie
HRT	Hormone replacement therapy
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IGF I	Insulin like growth factor I
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
kb	Kilo base pairs (Kilobasenpaare)
ml	Milliliter
mRNA	messengerRNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen, von engl. Mesenchymal stem cells
ng	Nanogramm
OC	Osteocalcin
P/S	Penicillin/ Streptomycin

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, von engl. Polymerase Chain Reaction
pH	pH-Wert
pmol	Pikomol
PPAR gamma	Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Gamma
qRT-PCR	Quantitative realtime PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Drehzahl, Umdrehungen pro Minute, von engl. Rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
Runx2	Runt-related transcription factor 2
TBS	Tris-gepufferte Salzmischung, engl. tris-buffered saline
TGF beta	Transforming Growth Factor beta
U	Units

1 Einleitung

Die Osteoporose als systemische Erkrankung des Knochenstoffwechsels ist die häufigste Skeletterkrankung des Menschen. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch ein erhöhtes Frakturrisiko als Folge eines Knochenmasseverlustes und veränderter Mikroarchitektur des Knochens (European foundation for osteoporosis 1991). Das Auftreten von Osteoporose ist bislang lediglich für den Menschen und Primaten beschrieben (Turner 2001; Cerroni et al. 2000). Die ovariectomisierte Ratte ist das bis dato am häufigsten genutzte Tiermodell für Osteoporose (Lelovas 2008; Egermann et al. 2005). Da die Testung neuer Therapieansätze und neu entwickelter Werkstoffe für den Knochen zunächst im Tiermodell erfolgt, ist eine möglichst lückenlose Charakterisierung der Pathophysiologie des Tiermodells essentiell um eine spätere Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen gewährleisten zu können (Turner 2001; Egermann et al. 2005).

Aktueller Gegenstand der Osteoporose-Forschung sind unter anderem die mesenchymalen Stammzellen (MSC, engl. Mesenchymal Stem Cells) des Knochenmarks. Sie spielen durch ihre Multipotenz und ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung eine wesentliche Rolle im Zuge der Knochenhomöostase und der Regeneration des Knochens (Caplan 1991; Rastegar et al. 2010; Benisch et al. 2012). Aufgrund dieser Eigenschaften sind Veränderungen der mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark möglicherweise Bestandteil der Pathophysiologie der Osteoporose. In mehreren Studien konnten bereits veränderte Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks osteoporotischer Spender im Vergleich zu MSC gesunder Spender festgestellt werden (Rodriguez J.P. 2000; Rodriguez et al. 1999; Benisch et al. 2012). In anderen Untersuchungen wurde hingegen kein abweichendes Verhalten der MSC osteoporotischer Spender beobachtet (Justesen J. 2002; Stenderup et al. 2001). Die genauen Zusammenhänge zwischen MSC im Knochenmark und dem Knochenmasseverlust im Zuge einer Osteoporose sind somit noch nicht vollständig aufgeklärt und bedürfen weiterer Studien.

Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks aus Osteoporose-Modellen der Ratte. Diese Untersuchungen erfolgten im Rahmen des Sonderforschungsbereich / Transregio 79 „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“ als Bestandteil des Teilprojektes B4 „Einfluss mehrphasiger Knochenersatzstoffe und oberflächenmodifizierter Titanlegierungen auf die Differenzierung von Osteoblasten/ MSC“ in Zusammenarbeit mit dem Teilprojekt T1. Im Rahmen des Teilprojekts T1 „Etablierung und Qualitätssicherung osteoporotischer Tiermodelle“ wurden verschiedene Arten der Osteoporose-Induktion im Kleintiermodell Ratte untereinander verglichen.

Die Induktion der Osteoporose erfolgte auf zwei unterschiedliche Arten: Zum Einen durch Ovariectomie und Gabe einer Calcium-defizitären Diät, zum Anderen durch Ovariectomie in Kombination mit der Gabe eines Steroids. Die Isolation der Stammzellen erfolgte drei und zwölf Monate nach der Ovariectomie. Scheinoperierte Ratten dienten für jede Standzeit als Kontrolle.

Die aus dem Knochenmark isolierten Stammzellen wurden hinsichtlich ihrer Morphologie, ihres osteogenen und adipogenen Differenzierungspotentials, ihres Selbsterneuerungspotentials sowie ihrer Migrationskapazität charakterisiert.

Ziel dieser Untersuchungen war es, den Einfluss unterschiedlicher Osteoporose-Induktionen auf die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks der Ratte zu ermitteln und diese näher zu charakterisieren.

Zu Beginn der Untersuchungen stellten sich folgende Fragen:

- Hat die Osteoporose-Induktion in der Ratte einen Einfluss auf die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks und wenn ja welchen?
- Wie wirken sich verschiedene Arten der Osteoporose-Induktion, und zwar die Ovariectomie in Kombination mit der Gabe einer Calcium-defizitären Diät oder die Ovariectomie in Kombination mit der Gabe eines Steroids auf die MSC des Knochenmarks aus? Sind Unterschiede zwischen den Induktionsmethoden bei Betrachtung der MSC zu erkennen?
- Welchen Einfluss hat die gewählte Standzeit, also die Dauer der Osteoporose-Induktion, auf die Eigenschaften der MSC?

- Inwiefern können Vergleiche zwischen den Charakteristika mesenchymaler Stammzellen aus Osteoporose-Modellen der Ratte mit humanen mesenchymalen Stammzellen osteoporotischer Spender gezogen werden?

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, die MSC aus dem Knochenmark der Ratte näher zu charakterisieren und somit einen tieferen Einblick in die pathophysiologischen Vorgänge in Osteoporose-Modellen der Ratte zu gewinnen.

2 Literaturübersicht

2.1 Osteoporose

Die Osteoporose ist eine systemische Erkrankung des Knochenstoffwechsels und ist gekennzeichnet durch einen Verlust an Knochenmasse und eine Veränderung der Mikroarchitektur des Knochens. Diese Änderungen in der Knochensubstanz führen zu einer erhöhten Knochenfragilität und somit für den Patienten zu einem erhöhten Frakturrisiko (European foundation for osteoporosis 1991). Ausgehend von den Ursachen für die Erkrankung unterscheidet man zwischen der primären und der sekundären Osteoporose. Hauptanteil aller Osteoporosen bilden die primären Osteoporosen, hierzu werden die idiopathischen Osteoporosen beim jungen Menschen, die postmenopausale Osteoporose (Typ I Osteoporose) und die senile Osteoporose (Typ II Osteoporose) gezählt. Sekundäre Osteoporosen sind die Folge anderer Primärerkrankungen oder sind medikamentös bedingt. Häufigste Ursache ist hier die Langzeittherapie mit Steroiden, die sogenannte steroidinduzierte Osteoporose (Lerner 2006). Die Diagnose von Osteoporose in der Klinik erfolgt meist mittels Knochendichtemessung in der Dual-Röntgen-Absorptiometrie, der sogenannten DEXA-Messung. Von der Weltgesundheitsorganisation WHO wird eine erniedrigte Knochendichtemessung in der Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA/DEXA) mit einem T-Wert von $\leq -2,5$ für die Diagnose einer Osteoporose festgelegt (Dachverband Osteologie e.V. 2009), das heißt Osteoporose ist definiert mit einer Knochendichte, die 2,5 Standardabweichungen oder mehr unter der Norm gesunder, junger Erwachsener liegt (Frost 1997). Sind bereits ein oder mehrere Frakturen infolge der Osteoporose aufgetreten, spricht man von einer manifesten Osteoporose (Dachverband Osteologie e.V. 2009).

Die Osteoporose ist die häufigste Skeletterkrankung (Lerner 2006) und tritt vor allem im höheren Lebensalter auf. Die Prävalenzen in Deutschland liegen bei postmenopausalen Frauen im Alter von 55 Jahren bei 7 % und im Alter von 80 Jahren bei 19 % (Dachverband Osteologie e.V. 2009). Häussler et al. ermitteln die Osteoporose-Prävalenzen in Deutschland auf 23,3 % bei Frauen und 7,1 % bei

Männern in einem Alter von 50 bis 64 Jahre. In der Altersgruppe von 65 bis 74 Jahren erhöhen sich die Prävalenzen auf 46,7 % bei Frauen und 11,4 % bei Männern (Deutscher Ärzte-Verlag GmbH und Ärzteblatt 2006; Häussler et al. 2007). In einer Telefonbefragung des Robert Koch-Instituts zum bundesweiten Gesundheitsmonitoring gaben Frauen ab dem 50. Lebensjahr viermal häufiger eine ärztlich diagnostizierte Osteoporose an als Männer (Robert Koch-Institut 2012). Weltweit zählten Johnell und Kanis für das Jahr 2000 insgesamt 9 Millionen osteoporotische Frakturen (Johnell und Kanis 2006).

Diese Zahlen belegen die große klinische und gesundheitspolitische Bedeutung der Osteoporose in der heutigen Gesellschaft.

2.1.1 Risikofaktoren für Osteoporose

Eine Vielzahl von Faktoren sind in der Lage die Entstehung einer Osteoporose zu begünstigen. Dazu zählt zum Einen die familiäre Veranlagung (Schuiling et al. 2011; Dachverband Osteologie e.V. 2009; Robert Koch-Institut 2012). Ist in der Familie bei Vater oder Mutter eine proximale Femurfraktur aufgetreten, gilt dies derzeit als verlässliche Angabe eines genetischen Risikos für die Tochter (Dachverband Osteologie e.V. 2009). Weiterer Risikofaktor ist das Alter, das Frakturrisiko verdoppelt sich etwa alle zehn Jahre (Dachverband Osteologie e.V. 2009). Frauen erkranken in der Regel bis zu viermal häufiger an Osteoporose (Robert Koch-Institut 2012), somit spielt das Geschlecht eine wesentliche Rolle als Risikofaktor (Schuiling et al. 2011; Robert Koch-Institut 2012; Dachverband Osteologie e.V. 2009). Sexualhormone wie Östrogen und Testosteron sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Knochenmasse (Lerner 2006). Ein Defizit dieser Hormone wie es im Alter und in der Menopause auftritt, führt zu einer verminderten Knochenmasse und somit zu einem erhöhten Osteoporose-Risiko (Lerner 2006; Taranta et al. 2002; Chen et al. 2005). Weitere Faktoren sind geringes Körpergewicht, Bewegungsmangel beziehungsweise Immobilität und Fehlernährung (Dachverband Osteologie e.V. 2009; Robert Koch-Institut 2012; Schuiling et al. 2011). Insbesondere die ausreichende Versorgung mit Kalzium, Vitamin D, Homozystein, Phosphor, Folsäure und Vitamin B₁₂ ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Knochenmasse (Schuiling et al. 2011; Dachverband Osteologie e.V. 2009). Des Weiteren wurden in Studien die negativen Auswirkungen von Alkoholo-

lismus und Nikotinkonsum auf die Knochengesundheit belegt (Schuiling et al. 2011; Ward und Klesges 2001). Darüber hinaus ist der negative Einfluss bestimmter Arzneimittel auf den Knochenstoffwechsel bekannt. Das Osteoporose-Risiko steigt bei längerer Einnahme dieser Wirkstoffe. Hierzu gehören Gonadotropin-Releasing Hormon Agonisten, Cyclosporin, Steroide und Glucocorticoide (Schuiling et al. 2011; Dore 2010).

2.1.2 Klinik der Osteoporose

Klinisch äußert sich Osteoporose durch auftretende Frakturen und ihre Folgen. Osteoporose-assoziierte Frakturen bedeuten für den Patienten, durch die damit verbundenen Schmerzen und die resultierende Immobilität, eine erhebliche Einbuße an Lebensqualität. Besonders häufig treten Frakturen im Bereich der Wirbelkörper, des Femurhalses und der Trochanter-Region sowie am distalen Radius auf. Diese Frakturen sind zudem mit einer erhöhten Mortalität insbesondere im ersten Jahr nach der Fraktur verbunden (Dachverband Osteologie e.V. 2009).

Bei den auftretenden Frakturen handelt es sich entweder um Spontanfrakturen, das heißt ohne äußere Gewalteinwirkung oder lediglich durch Bagateltraumen verursacht, oder um Frakturen als Folge eines Sturzes. Diesbezüglich wird die Definition und Diagnose der Osteoporose, sowie die Einteilung in unterschiedliche Schweregrade kontrovers diskutiert (Frost 1997). In der DEXA-Messung wird zur Diagnose lediglich die Knochenmasse ermittelt, nicht die tatsächliche Stabilität der Knochen. Daher wird empfohlen, dass eine Osteoporose in der Knochendichtemessung erst sicher diagnostiziert werden kann, wenn zuvor eine Fraktur aufgetreten ist (Lerner 2006).

2.1.3 Pathophysiologie der Osteoporose

Knochen unterliegt physiologisch einem permanenten Zusammenspiel von Knochenauf- und Abbau. Die hierbei aktiven dynamischen Prozesse sind das sogenannte „bone modeling“ und „bone remodeling“ (Frost 1997; Frost H.M. 1992; Lerner 2006; Schuiling et al. 2011). „Bone Modeling“ findet vorwiegend in Kindheit und Jugend statt und ermöglicht dem Knochen Veränderungen in Größe und Form. Charakteristikum des „Bone Modeling“ ist, dass Knochenresorption und

Knochenformation an separaten Knochenoberflächen stattfinden, zum Beispiel die Resorption endocortical und die neue Knochenformation periostal (Schuiling et al. 2011; Frost 1997). Im Erwachsenenalter findet kein Längenwachstum und keine Zunahme an Knochensubstanz mehr statt, dennoch unterliegt der Knochen weiterhin dynamischen Umbauprozessen. Grund hierfür ist die Rolle des Knochens in der Aufrechterhaltung der Mineralhomöostase des Körpers, seine Anpassung an veränderte mechanische Belastungen und die Reparatur kleiner Mikrofrakturen (Lerner 2006). Dieser lebenslange Prozess im adulten Skelett ist das sogenannte „Bone Remodeling“ (Lerner 2006; Frost 1997; Frost H.M. 1992; Schuiling et al. 2011). Hierbei findet durch sogenannte BMUs (von engl. Basic-Multicellular-Units) Resorption und Formation an der gleichen Knochenoberfläche statt. BMUs setzen sich zusammen aus den knochenbildenden Osteoblasten, Osteozyten innerhalb der Knochenmatrix und knochenabbauenden Osteoklasten (Sims und Gooi 2008). Diese Zellen wirken in einem koordinierten Zusammenspiel. Befindet sich Auf- und Abbau durch diese Zellen in einem Gleichgewicht, findet physiologisches „Bone Remodeling“ statt. Ein Ungleichgewicht zugunsten des Knochenabbaus führt zu Entwicklung der Osteoporose.

2.1.3.1 Der Zyklus des Bone Remodeling

Der Zyklus des „Bone Remodeling“ wird koordiniert durch die Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellen der BMUs, also zwischen Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und deren entsprechender Vorläuferzellen. Die Vorläuferzellen der knochenbildenden Osteoblasten sind die mesenchymalen Zellen des Knochenmarks (Dominici et al. 2006). Die knochenabbauenden Osteoklasten formieren sich aus mononukleären, hämatopoetischen Vorläuferzellen (Sims und Gooi 2008). Der initiale Schritt im „Bone Remodeling“ ist die Rekrutierung von Osteoklasten aus ihrem Präkursoren-Pool und deren Aktivierung. Dies erfolgt durch von Osteoblasten gebildete Zytokine, welche die Osteoklastenformation stimulieren. Die Zellen der Osteoblastenlinie produzieren die Zytokine RANK-Ligand (von engl. Receptor Activator of NF- κ B Ligand, RANKL), Osteoprotegerin (OPG) und M-CSF (von engl. Macrophage colony-stimulating factor, dt. Monozytenkolonien-stimulierender Faktor) (Suda et al. 1999; Simonet et al. 1997; Bucay et al. 1998). RANKL interagiert mit dem auf der Zelloberfläche von häma-

topoetischen mononukleären Vorläuferzellen exprimierten Rezeptor RANK (Receptor Activator of NF- κ B) und triggert so die Osteoklastenformation (Dougall et al. 1999). Zusätzlich dazu treibt M-CSF die Proliferation der Osteoklastenvorläufer an und stimuliert die Expression des Rezeptors RANK (van Wesenbeeck 2002; Arai et al. 1999). Osteoprotegerin wiederum blockiert die Interaktion von RANKL und RANK und wirkt somit inhibitorisch auf die Osteoklastogenese (Bucay et al. 1998; Simonet et al. 1997). Durch die Bildung von RANKL und OPG sind somit die Zellen der Osteoblastenlinie in der Lage, die Rekrutierung und Formation der Osteoklasten präzise zu regulieren. Diese beiden Zytokine werden, um eine koordinierte Regulation zu ermöglichen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Osteoblastendifferenzierung gebildet (Pivonka et al. 2008). Osteozyten sind ausdifferenzierte Osteoblasten und liegen innerhalb der mineralisierten Knochenmatrix. Ihre Rolle im „Bone Remodeling“ ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In einer Studie von Tatsumi et. al konnte gezeigt werden, dass Apoptose von Osteozyten, wie sie bei Mikrofrakturen des Knochens auftreten, zu einer erhöhten RANKL Produktion und somit zu einer erhöhten Osteoklastenformation führte (Sawako et al. 2007).

Nach abgeschlossener Osteoklastenformation beginnen die nun reifen Osteoklasten mit dem Knochenabbau. Die Osteoklasten binden an die extrazelluläre Matrix des Knochens und rufen in der Resorptionslakune (Howship-Lakune) mittels Protonenpumpen und Chloridkanälen ein saures Milieu hervor. Dieses saure Milieu ermöglicht die Auflösung der Hydroxylapatit-Kristalle. Die organischen Bestandteile des Knochens werden durch proteolytische Enzyme abgebaut (Lerner 2006).

An die Resorption des Knochens schließt sich im Folgenden die Periode der erneuten Knochenbildung durch die Osteoblasten an. Sie füllen die Resorptionslakune mit neuer Knochenmatrix. Zunächst wird die Knochenmatrix von den Osteoblasten gebildet und im Anschluss mineralisiert (Sims und Gooi 2008). Dieser Prozess dauert bis zu vier Monate (Schuiling et al. 2011).

2.1.3.2 „Bone Remodeling“ und Osteoporose

Bei der Osteoporose ist die Balance zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau zugunsten des Abbaus gestört. Dieses Ungleichgewicht kann durch einen erhöhten

Knochenabbau, durch einen verminderten Knochenaufbau oder die Kombination dieser beider Phänomene entstehen. Bei postmenopausaler Osteoporose findet sich eine erhöhte Frequenz an „Bone Remodeling“ sowie eine verminderte Fähigkeit der Osteoblasten zur Knochenneubildung (Lerner 2006).

2.1.3.3 Der Einfluss von Östrogen auf den Knochenstoffwechsel

Das Sexualhormon Östrogen spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation des Knochenstoffwechsels. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind sehr komplex, vielseitig und bislang noch nicht vollends aufgeklärt. Es ist jedoch bewiesen, dass Östrogen regulatorischen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel über die direkte Einwirkung auf die Knochenzellen, über das Immunsystem und über oxydativen Stress ausübt (Weitzmann 2006). Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten exprimieren Rezeptoren für Östrogen (Weitzmann 2006; Lerner 2006). Es gibt zwei verschiedene Arten von Östrogen-Rezeptoren, Östrogen-Rezeptor alpha ($ER\alpha$) und Östrogen-Rezeptor beta ($ER\beta$). $ER\alpha$ wird in Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert, die Expression von $ER\beta$ in Osteoklasten wird kontrovers diskutiert (Lerner 2006). Die Effekte des Östrogens auf den Knochen werden in der Regel über den $ER\alpha$ vermittelt (Barkhem et al. 1998).

Über die Bindung an den Rezeptoren auf Osteoblasten und Osteoklasten bewirkt Östrogen eine Förderung der Knochenformation und eine Verminderung des Knochenabbaus.

Die Zelllinie der Osteoklasten betrachtend ist der Effekt des Östrogens die Inhibierung der Osteoklasten-Aktivität und der Osteoklastogenese.

Östrogen bindet an Rezeptoren auf Osteoklasten und blockiert über die Stimulation verschiedener Mediatoren die Osteoklasten-Aktivität (Schuiling et al. 2011; Taranta et al. 2002). Darüber hinaus hat Östrogen einen pro-apoptotischen Effekt auf Osteoklasten (Chen et al. 2005; Kousteni 2003; Hughes et al. 1996; Weitzmann 2006). Während der Osteoklastogenese ist die Expression des $ER\alpha$ herunter reguliert (Garcia Palacios 2005). Des Weiteren konnten Srivastava et. al eine verminderte Sensitivität der Osteoklasten für RANKL unter dem Einfluss von Östrogen feststellen (Srivastava 2000).

Die Effekte des Östrogens auf die knochenbildenden Osteoblasten sind dagegen fördernder Natur. Östrogen verhindert die Apoptose von Osteoblasten (Manolagas

2000a). Des Weiteren stimuliert Östrogen in vitro die Produktion der Osteoblasten von Typ I Kollagen (Ernst et al. 1989). Das nicht mineralisierte Grundgerüst des Knochens besteht zu einem wesentlichen Anteil aus Kollagen Typ I. Es dient als Grundgerüst für die nachfolgende Mineralisierung. Hofbauer et. al konnten zudem nachweisen, dass Östrogen die mRNA Expression von OPG in Osteoblasten erhöht (Hofbauer et al. 1999b), was wiederum einen inhibitorischen Effekt auf die Osteoklasten-Formierung bedeutet.

2.1.3.4 Die postmenopausale Osteoporose

Der Zusammenhang zwischen Östrogendefizit und Osteoporose wurde erstmals von Fuller Albright im Jahr 1941 beschrieben (Compston 2004; Forbes 1991).

Durch den Wegfall der Effekte des Östrogens in einem Östrogendefizit, wie es in der Menopause auftritt, resultiert eine verstärkte Osteoklasten-Formation und Aktivierung. Des Weiteren entwickelt sich eine verminderte Knochenformation durch die fehlenden pro-osteoblastären Effekte des Östrogens. Neuere Studien belegen außerdem einen Einfluss des Östrogens auf das Immunsystem im Knochen, so bewirkt ein Östrogendefizit eine erhöhte Produktion inflammatorischer Zytokine, die ihrerseits Einfluss auf die Knochenzellen nehmen. So erhöht ein Östrogendefizit die Produktion an Interleukin 7 und Tumornekrosefaktor (TNF), welche beide die Osteoblasten-Aktivität limitieren (Weitzmann et al. 2002). TNF hat zudem einen stimulierenden Einfluss auf die Osteoklastogenese (Weitzmann 2006; Pfeilschifter 2002).

Östrogene werden auch als Therapeutikum in der Osteoporose-Therapie eingesetzt (Compston 2004; Kanis et al. 2008). Man spricht von der sogenannten Hormonersatztherapie (HET, engl. HRT Hormone Replacement Therapy). Die erhöhte Frequenz des „Bone Remodeling“ in der Menopause kann durch die Einnahme von Östrogenen reduziert werden. Der Verlust an Knochenmasse wird im gesamten Skelett verhindert. Durch Östrogene kann das Frakturrisiko um bis zu 30% gesenkt werden (Kanis et al. 2008). Allerdings ist die Therapie mit Östrogenen mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen verbunden, wie zum Beispiel Brustkrebs. Daher wird die Osteoporose-Therapie mittels Östrogenen heutzutage nur für postmenopausale Frauen mit weiteren Wechseljahresbeschwerden empfohlen (Kanis et al. 2008; Compston 2004).

2.1.3.5 Die Glucocorticoid-induzierte Osteoporose

Glucocorticoide wie Prednisolon, Methylprednisolon und Dexamethason finden ihren Einsatz aufgrund ihrer antiinflammatorischen Eigenschaften in der Therapie von zahlreichen Erkrankungen wie Autoimmun-Erkrankungen, chronisch entzündlichen Erkrankungen, rheumatologischen Erkrankungen, Krebserkrankungen oder in der Transplantations-Medizin (Dore 2010; Bouvard et al. 2010). Unerwünschte Nebenwirkungen dieser Arzneimittel sind unter anderem deren Effekte auf den Knochenstoffwechsel. Glucocorticoide sind die Hauptursache für die Entwicklung einer sekundären Osteoporose (Bouvard et al. 2010; Canalis et al. 2004). Glucocorticoide haben direkte und indirekte Effekte auf den Knochenstoffwechsel, zusammengefasst resultierend in einer verminderten Knochenformation und einer erhöhten Knochenresorption (Bouvard et al. 2010).

Zu den direkten Effekten zählen die Einflüsse von Glucocorticoiden auf die Zellen des Knochens. In unterschiedlichen Studien konnte eine Stimulierung der Osteoklastogenese sowie eine Steigerung der Osteoklasten-Aktivität durch Glucocorticoide nachgewiesen werden (Manolagas und Weinstein 1999; Yao et al. 2008). Die knochenbildenden Zellen betrachtend wird die Osteoblasten-Funktion und Lebenszeit durch Glucocorticoide vermindert (Weinstein et al. 1998). Des Weiteren erhöhen Glucocorticoide die Apoptoserate von Osteoblasten und Osteozyten (Weinstein et al. 1998; Manolagas 2000b). Darüber hinaus haben Glucocorticoide einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von mesenchymalen Vorläuferzellen. Pereira et. al beobachteten einen Wechsel hin zur adipogenen Differenzierung unter dem Einfluss von Kortisol (Pereira et al. 2002). Dies würde wiederum einen Verlust an knochenbildenden Osteoblasten bedeuten.

Glucocorticoide haben auch zahlreiche Effekte auf den Knochenstoffwechsel auf molekularer Ebene. Die Expression Osteoklasten-stimulierenden Zytokine wie RANKL (Hofbauer et al. 1999a) und M-CSF (Rubin et al. 1998) wird in der Anwesenheit von Glucocorticoiden hoch reguliert. Das auf die Osteoklastogenese inhibitorisch wirkende Zytokin OPG hingegen wird schwächer exprimiert (Hofbauer et al. 1999a). Darüber hinaus blockieren Glucocorticoide den stimulatorischen Effekt von Insulin-like growth factor I (IGF I) auf die Knochenformation (Canalis et al. 2004). Die Transkription von IGF I ist unter dem Einfluss von Glucocorticoiden vermindert (Delany et al. 2001).

Die indirekten Effekte auf den Knochen sind zum Einen die verminderte Absorption von Calcium und Vitamin D im Darm und die erhöhte renale Calcium-Ausscheidung durch Glucocorticoide (Canalis et al. 2004; Dore 2010). Des Weiteren verursachen Glucocorticoide eine Form der Myopathie. Die geschädigte Muskulatur bildet ein erhöhtes Risiko eines Sturzes und somit für eine Fraktur (Dore 2010; Canalis et al. 2004). Darüber hinaus werden durch Glucocorticoide die Östrogen- und Testosteron-Level gesenkt (Canalis et al. 2004; Dore 2010).

Was ebenso immer einen Einfluss auf die Knochengesundheit der Glucocorticoid behandelten Patienten hat, ist deren zugrunde liegende Primärerkrankung. Diese Primärerkrankungen erhöhen oft ohnehin schon das Osteoporose-Risiko. So ist beispielsweise bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen die Aufnahme von Calcium und Vitamin D aus dem Darm gestört (Dore 2010; Canalis et al. 2004).

2.2 Tiermodelle für Osteoporose

Osteoporose ist eine Erkrankung, die lediglich beim Menschen und Primaten auftritt (Turner 2001; Egermann et al. 2005; Cerroni et al. 2000). Daher werden Tiermodelle zur Validierung neuer Therapieansätze, wie neu entwickelter Arzneimittel oder zur Biokompatibilitätsüberprüfung von Implantaten, für den osteoporotischen Knochen benötigt (Egermann et al. 2005; Turner 2001). Bislang wurden mehrere Tierarten in Osteoporosemodellen eingesetzt und getestet, wie Affen, Hunde, Katzen, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten, Mäuse, Schafe und Mini-Pigs (Turner 2001; Egermann et al. 2005; Jee W.S.S. 2001). Jede dieser Tierarten weist unterschiedliche Charakteristika im Knochenstoffwechsel auf und wird in der Literatur bezüglich ihrer Vor- und Nachteile als Osteoporosemodell kontrovers diskutiert (Jee W.S.S. 2001; Egermann et al. 2005; Turner 2001). Des Weiteren existieren verschiedene Möglichkeiten der Osteoporose-Induktion. Da Östrogendefizit eine der Hauptursachen insbesondere für die postmenopausale Osteoporose beim Menschen ist, ist die am häufigsten verwendete Induktionsmethode die Ovariectomie (Turner 2001; Egermann et al. 2005; Jee W.S.S. 2001). Zusätzlich zur Ovariectomie werden weitere Methoden wie die Gabe Calcium-restriktiver Diäten, Glucocorticoid-Gaben und die Immobilisation angewendet (Egermann et al. 2005; Turner 2001). Darüber hinaus existieren verschiedene Knock-out Modelle wie das Modell der SAMP6-Maus, ein Modell für einen

beschleunigten Alterungsprozess und somit für die senile Osteoporose (Ichioka et al. 2002).

Die Auswahl des geeigneten Tiermodells ist schwierig, da keines dieser Modelle in der Lage ist, die humane Osteoporose exakt widerzuspiegeln (Aerssens et al. 1998). Es sollte auch mit in Betracht gezogen werden, was genau in dem gewählten Modell evaluiert werden soll, so macht es einen Unterschied ob Medikamente oder ob Implantate getestet werden sollen (Thompson et al. 1995).

Nicht zuletzt müssen bei der Wahl eines Tiermodells auch vor allen Dingen die ethischen Aspekte mit in Betracht gezogen werden. Vor der Entscheidung für ein bestimmtes Tiermodell sollten unter Anderem folgende Fragen kritisch beurteilt werden (Thompson et al. 1995; Turner 2001):

- Ist das geplante Modell für den Zweck der Untersuchungen angemessen?
- Gibt es eventuell eine in vitro Alternative für die geplanten Untersuchungen?
- Sind die zu erwartenden Ergebnisse auf die humane Situation übertragbar?
- Sind die minimalsten Belastungen für das Tier gewählt?

Die Richtlinien der „Food and Drug Administration“ (Food and Drug Administration Division of metabolism and Endocrine Drug Products FDA 1994) empfehlen die Nutzung von zwei unterschiedlichen Tiermodellen, da kein Tiermodell allein in der Lage ist, die Situation der humanen Osteoporose widerzuspiegeln. Zum Einen sollte die ovariectomierte Ratte als angemessenes Modell für Veränderungen im spongiösen Knochen des Menschen genutzt werden. Zum Anderen sollte jedes Agens zusätzlich in einem Großtiermodell evaluiert werden. Dabei gilt die ovariectomierte Ratte als sogenannte „Modeling Spezies“, weil hier hauptsächlich „bone modeling“ im Knochenstoffwechsel stattfindet. Das Großtiermodell dient als „Remodeling Spezies“ (Food and Drug Administration Division of metabolism and Endocrine Drug Products 1994).

2.2.1 Die ovariectomierte Ratte als Modell für Osteoporose

Die ovariectomierte Ratte ist das bislang am häufigsten genutzte und am besten studierte Tiermodell für Osteoporose (Egermann et al. 2005; Lelovas 2008). Wie alle Tiermodelle hat auch dieses Modell Vor- und Nachteile und wird in der Literatur zum

Teil kontrovers diskutiert. Der durch die Ovariectomie erreichte Verlust an Knochenmasse ist gekennzeichnet durch einen erhöhten Knochenumsatz, wobei die Knochenresorption stärker ausgeprägt ist als die Knochenformation (Kalu 1991; Frost H.M. 1992). In dieser Hinsicht repräsentiert das Modell sehr gut die Situation, wie sie für die postmenopausale Osteoporose beim Menschen beschrieben wird. Des Weiteren verläuft der Verlust an Knochenmasse, ebenso wie beim Menschen (Gallagher 1990), biphasisch. Initial ist sowohl bei der Osteoporose des Menschen als auch bei der ovariectomierten Ratte eine Phase des sehr rapiden Knochenmasseverlusts festzustellen. Dem schließt sich eine intermediäre Phase an, wo sich der Knochenumsatz auf einem osteopenischen Level stabilisiert. In einer zweiten Phase erfolgt der Verlust an Knochenmasse wesentlich langsamer (Kalu 1991; Gallagher 1990; Wronski et al. 1989). Diese zweite langsame Phase tritt bei der Ratte nach etwa 270 Tagen ein (Wronski et al. 1989; Kalu 1991). Der Verlust an trabekulärem Knochen übersteigt bei Ratte wie Mensch den Verlust an kortikalem Knochen (Kalu 1991). Darüber hinaus finden sich bei der ovariectomierten Ratte ähnliche Veränderungen in der Frakturheilung wie beim osteoporotischen Knochen des Menschen. McCann et al. stellten nach Ovariectomie eine verzögerte Frakturheilung an Ratten fest (McCann et al. 2008).

Ein Nachteil des Modells ist das Nichtauftreten von Spontanfrakturen bei den Tieren. Frakturen sind jedoch Teil der Definition einer manifesten Osteoporose (Dachverband Osteologie e.V. 2009). Dieses Phänomen ist jedoch bislang einzig für das Modell der SAMP6-Maus beschrieben (Ophoff und Vanderschueren 2005). Des Weiteren wird am Modell der ovariectomierten Ratte kritisiert, dass in deren Knochenstoffwechsel hauptsächlich „Bone Modeling“ stattfindet, das Krankheitsbild der Osteoporose jedoch durch „Bone Remodeling“ geprägt ist (Lelovas 2008). Entscheidender Aspekt hierbei ist das Alter der Ratte und welche Stelle an welchem Knochen untersucht wird. Bei der Ratte findet sich abhängig vom Alter ein Übergang zum „Bone Remodeling“ (Lelovas 2008). Grund hierfür ist das Wachstum beziehungsweise das Längenwachstum der Knochen. Eine Ratte erreicht ihre maximale Knochenmasse mit circa zehn Monaten (Lelovas 2008), die Wachstumsfugen an der proximalen Tibia einer weiblichen Ratte sind bis etwa zum 15. Monat noch nicht verknöchert (Jee W.S.S. 2001). Ab dem Alter von zwölf Monaten findet in Tibia und Lendenwirbeln von Ratten vornehmlich „Remodeling“ statt. Das heißt, der Knochenstoffwechsel der Ratte ist dann mit dem des Menschen vergleichbar, sobald das Längenwachstum abgeschlossen ist. Zu Studien zur Osteoporose-Induktion in der Ratte, die länger als

zwölf Monate andauern, finden sich jedoch relativ wenig Daten und der Knochenumsatz in den ovariectomierten Tieren kehrt zurück auf das Level von Kontrolltieren (Thompson et al. 1995). Werden zum Zeitpunkt der Induktion jüngere Tiere genutzt, erreichen diese wesentlich niedrigere Knochenmassen als unbehandelte Tiere. Eine niedrige maximale Knochenmasse ist ein großer Risikofaktor für die Entwicklung einer Osteoporose beim Menschen (Lelovas 2008; Jee W.S.S. 2001).

Darüber hinaus muss mit in Betracht gezogen werden, welcher Knochen des Tieres untersucht wird. Die Veränderungen finden nicht gleichmäßig im gesamten Skelett statt, sondern es finden sich Unterschiede an spezifischen Stellen des Skeletts. So induziert die Ovariectomie keinen Verlust an Knochenmasse in den Epiphysen der langen Röhrenknochen, in der distalen Tibia oder den Schwanzwirbeln (Jee W.S.S. 2001; Lelovas 2008). Es sollten keine Untersuchungen im Bereich von Wachstumsfugen vorgenommen werden, um Verfälschungen und Fehler durch physiologisches Längenwachstum zu vermeiden (Lelovas 2008).

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass Alter und Knochen des Tieres sorgfältig für die geplanten Untersuchungen gewählt werden müssen, um Fehler des Tiermodells in der Übertragbarkeit auf den Menschen zu minimieren. Essentiell ist hierbei insbesondere auch die Etablierung geeigneter Kontroll-Gruppen, wie zum Beispiel unbehandelte oder scheinoperierte Tiere, um die Änderungen exakt beurteilen zu können (Lelovas 2008; Jee W.S.S. 2001).

Ein weiterer negativer Aspekt des Modells der ovariectomierten Ratte ist, dass sie eine Knochenstruktur der Kortikalis ohne Havers-System hat und somit auch kein „Remodeling“ im Havers-System stattfindet (Jee W.S.S. 2001; Lelovas 2008; Egermann et al. 2005). Hauptgrund für die kortikale Porosität bei der humanen Osteoporose ist jedoch das „Remodeling“ im Havers-System (Lelovas 2008).

Die ovariectomierte Ratte als Modell für Osteoporose zeigt zusammen genommen viele Vorteile. Es finden sich jedoch auch Nachteile, die durch sorgfältige Planung und gut gewählte Kontrollen zum Teil umgangen werden können. Dennoch muss immer berücksichtigt werden, dass es sich lediglich um ein Modell handelt, das nie exakt die Situation der humanen Osteoporose nachahmen kann (Aerssens et al. 1998). Egermann et. al schreiben hierzu, dass der Begriff „Osteoporose“ in Bezug auf Tiermodelle sehr vorsichtig genutzt werden sollte (Egermann et al. 2005) und auch D. Kalu würde in Bezug auf die Limitationen des Modells der ovariectomierten Ratte eher den Begriff der „Osteopenie“ wählen (Kalu 1991).

2.2.2 Kombinationen verschiedener Induktionsmethoden bei der Ratte

Um die Effekte der Ovariectomie auf die Knochendichte noch zu verstärken oder zu beschleunigen, werden in Studien häufig Kombinationen mit anderen Induktionsmethoden wie der Gabe Calcium-restriktiver Diäten oder von Glucocorticoiden und die Immobilisation angewendet (Egermann et al. 2005; Lelovas 2008).

Die Kombination mit der Immobilisation führt zu einem verstärkten Verlust an Knochenmasse (Lelovas 2008; Egermann et al. 2005; Jee W.S.S. 2001). Allerdings ist dieser verstärkte Knochenabbau lokal auf die immobilisierte Region begrenzt, die Osteoporose des Menschen jedoch ist eine systemische Skeletterkrankung. Darüber hinaus ist diese Induktionsmethode unter ethischen Gesichtspunkten durch die Belastung des Tieres kritisch zu beurteilen (Egermann et al. 2005).

Die Gabe von Calcium-restriktiven Diäten wird in der Regel in Kombination mit der Ovariectomie angewendet, selten als alleinige Induktionsmethode (Egermann et al. 2005). Ein reduzierter Calcium-Gehalt des Futters beziehungsweise ein verändertes Calcium-Phosphor Verhältnis in Kombination mit der Ovariectomie führt zu einer niedrigeren Knochendichte (Egermann et al. 2005; Koshihara et al. 2004; Lill et al. 2002; Shen et al. 1997).

Die Kombination mit der Gabe von Glucocorticoiden wird in Studien zum Teil widersprüchlich bewertet. So konnten Shen et. al in einer Studie an ovariectomierten Ratten durch die Gabe von Prednisolon keinen erhöhten Verlust an Knochenmasse durch das Glucocorticoid feststellen, im Gegenteil wurde hier sogar eine Inhibierung der Knochenresorption durch Prednisolon diskutiert (Shen et al. 1997). Im Gegensatz dazu wird in anderen Untersuchungen die Gabe von Glucocorticoiden im Tiermodell zur Induktion einer Osteoporose positiv bewertet (Nitta et al. 1999; Egermann et al. 2005).

2.3 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC, engl. Mesenchymal Stem Cells) sind nicht-hämatopoetische Zellen, die in der Lage sind, zu unterschiedlichen Zelltypen zu differenzieren (Caplan 1991; Chamberlain et al. 2007; Rastegar et al. 2010; Uc-

celli et al. 2008). Die Erstbeschreibung nicht-hämatopoetischer Zellen im Knochenmark als multipotente Vorläuferzellen erfolgte durch Friedenstein et al. (Friedenstein et al. 1968; Friedenstein et al. 1976). Mesenchymale Stammzellen haben die Fähigkeit der Selbsterneuerung und zur Differenzierung in unterschiedlichste Gewebe wie Knorpel, Knochen (Caplan 1991), Fettgewebe, Sehngewebe und Nervengewebe (Chamberlain et al. 2007; Rastegar et al. 2010; Uccelli et al. 2008). Durch diese Fähigkeiten haben sie eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung und Regeneration des entsprechenden Gewebes. Mesenchymale Stammzellen finden sich in fast allen Geweben des Körpers und wurden aus verschiedenen Quellen bislang für in vitro Studien isoliert, wie Knochenmark, Knochen-Bohrmehl (Wenisch et al. 2005), Fettgewebe (Zuk et al. 2002), Amnionflüssigkeit (Anker et al. 2003), Periost (Nakahara et al. 1991) und fetalem Gewebe (Campagnoli et al. 2001). Der prozentuale Anteil mesenchymaler Stammzellen im Gewebe, zum Beispiel im Knochenmark, ist relativ gering, so bilden sie in einem Knochenmarks-Aspirat etwa 0,001 bis 0,01 % aller Zellen (Moroni und Fornasari 2012). Durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Proliferation kann ihre Anzahl in der Kultur jedoch stark vervielfältigt werden (Moroni und Fornasari 2012; Rastegar et al. 2010; Chamberlain et al. 2007).

Die Morphologie von mesenchymalen Stammzellen in vitro ist heterogen, die Kulturen setzen sich zusammen aus spindelzellförmigen, Fibroblasten ähnlichen Zellen und größeren, flacheren Zellen (Colter 2001; Tuli R. 2003; Uccelli et al. 2008).

Mesenchymale Stammzellen haben des Weiteren die Fähigkeit zur Migration (Chamberlain et al. 2007). In Zusammenhang mit der Geweberegeneration ermöglicht dies die Migration zum Ort der Gewebeschädigung. Die genauen Mechanismen sind hierbei noch nicht vollends aufgeklärt, es wurde jedoch die Expression von Rezeptoren für Chemokine sowie für Adhäsionsmoleküle, wie sie bei der Migration von Leukozyten beteiligt sind, bei MSC nachgewiesen (Chamberlain et al. 2007).

Weitere Charakteristiken mesenchymaler Stammzellen sind deren nicht-immunogene Eigenschaften, das heißt sie lösen keine Immunantwort aus (Rastegar et al. 2010; Uccelli et al. 2008). Dadurch ist bei allogener Transplantation keine Immunsuppression notwendig (Chamberlain et al. 2007). Des Weiteren wurden in Studien überdies auch immun-suppressive Eigenschaften von mesen-

chymalen Stammzellen nachgewiesen, zum Beispiel durch Einfluss auf T- Lymphozyten (Bartholomew et al. 2002; Di Nicola et al. 2002).

All diese Eigenschaften machen mesenchymale Stammzellen zu einem vielversprechenden Werkzeug in der Entwicklung neuer Therapieansätze für verschiedenste Erkrankungen, insbesondere für die Geweberegeneration (Moroni und Fornasari 2012; Parekkadan und Milwid 2010; Rastegar et al. 2010; Uccelli et al. 2008). Eine Gefahr der Stammzell-Therapie ist in Studien kontrovers diskutiert, und zwar deren möglicher Einfluss auf Tumor-Entwicklung, Tumor-Wachstum und Metastasenbildung. Dies ist möglicherweise die Folge ihrer immunsuppressiven Eigenschaften (Uccelli et al. 2008). Rosland et. al konnten zudem in Langzeitkulturen humaner mesenchymaler Stammzellen eine spontane maligne Transformation feststellen (Rosland et al. 2009).

Dennoch besteht die generelle Meinung, dass MSC sicher in vitro kultiviert und als Therapeutikum eingesetzt werden können und bislang ist noch kein Fall von Tumor-Entwicklung nach einer Stammzell-Therapie bekannt (Uccelli et al. 2008). Mesenchymale Stammzellen sind daher von großem Interesse für die Entwicklung neuer Therapien für verschiedenste Erkrankungen wie zum Beispiel Knochen-, Knorpel- und Sehnendefekte, systemische Skeletterkrankungen (Chanda et al. 2010) und ischämische Herzerkrankungen (Chamberlain et al. 2007; Rastegar et al. 2010; Teven et al. 2011). In einem Tiermodell für Osteoporose, der SAMP6-Maus, ist es durch Injektion allogenen Knochenmarks in die Knochenmarkhöhle gelungen, die Knochendichte wieder zu erhöhen (Ichioka et al. 2002). MSC sind daher aktuell Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Darüber hinaus kann durch die detaillierte Charakterisierung von MSC ein besseres Verständnis der Pathophysiologie bestimmter Erkrankungen gewonnen werden.

2.3.1 Kriterien für MSC in in-vitro Studien

Um die Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Studien trotz unterschiedlicher Isolations- und Kultivierungsmethoden zu gewährleisten, wurden bestimmte Kriterien für mesenchymale Stammzellen definiert (Dominici et al. 2006). Zum Einen müssen MSC in der Kultur Plastik-adhärent sein (Dominici et al. 2006). Die Zellen müssen auch eine Differenzierungskapazität in unterschiedliche Gewebe wie Knochen, Knorpel und Fett aufweisen (Dominici et al. 2006;

Chamberlain et al. 2007; Rastegar et al. 2010). Darüber hinaus zeigen mesenchymale Stammzellen ein bestimmtes Expressionsmuster für Oberflächen-Antigene. MSC sind negativ für Oberflächen-Antigene der hämatopoetischen Linie wie Cluster of Differentiation (CD) 45, CD34, CD14 und CD11. Die Oberflächenmarker CD105, CD90 (Thy-1), CD73, CD44 und CD 71 sollten dagegen von MSC exprimiert werden (Uccelli et al. 2008; Dominici et al. 2006; Chamberlain et al. 2007).

Dazu muss jedoch erwähnt werden, dass die Expressionsmuster für die Oberflächen-Antigene variieren können, abhängig von Spezies, Gewebe und Kulturbedingungen (Chamberlain et al. 2007; Uccelli et al. 2008).

2.3.2 Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in-vitro

Um ein wesentliches Kriterium für Stammzellen zu erfüllen, müssen MSC in vitro zur Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten induziert werden können (Dominici et al. 2006). Dies erfolgt in der Kultur mittels Zusatz spezifischer Differenzierungsfaktoren. Der Erfolg der Induktion kann durch verschiedene Methoden wie spezifische Färbungen und molekularbiologische Untersuchungen überprüft werden. Über diese drei Differenzierungswege hinaus ist es aber auch bereits gelungen, MSC in vitro zu weiteren Zelltypen zu differenzieren. So konnten zum Beispiel Wakitani et. al MSC aus dem Knochenmark von Ratten zu rhythmisch kontrahierenden Myoblasten differenzieren (Wakitani et al. 1995). Auch die Differenzierung zu Neuronen-ähnlichen Zellen aus MSC ist bereits durchgeführt worden (Woodbury et al. 2000).

2.3.2.1 Differenzierung von MSC zu Osteoblasten in vitro: Die osteogene Differenzierung

Die Induktion zur osteogenen Differenzierung erfolgt klassischerweise durch Zusatz der Differenzierungsfaktoren Ascorbinsäure, β -Glycerolphosphat und Dexamethason zum Standardmedium über zwei bis drei Wochen (Chamberlain et al. 2007).

Collin et. al teilen die darauf einsetzende Differenzierung in vier Phasen ein (Collin et al. 1992):

- Proliferation der Zellen
- Zusammenlagerung der Zellen zu Clustern oder Zellinseln, sogenannten „bone nodules“
- Phase der Matrixbildung durch die Zellen und aktive Sekretion von Proteinen
- Phase der Matrix-Mineralisation und Formierung neuer Zell-Cluster

Die Überprüfung der Differenzierung kann zum einen über spezifische Färbungen erfolgen. Bei der osteogenen Differenzierung werden Anfärbungen der mineralisierten Matrix angewendet, wie zum Beispiel die Alizarinrot-Färbung oder die Von Kossa Färbung (Chamberlain et al. 2007).

Mittels molekularbiologischer Methoden kann die Expression spezifischer Proteine und Transkriptionsfaktoren, sogenannter Differenzierungsmarker, untersucht werden. Die Differenzierung der Zellen erfolgt über noch nicht vollends aufgeklärte, komplexe Signalwege (Hofmann et al. 2009). Ein „Master-Regulator“ für die osteogene Differenzierung ist der Transkriptionsfaktor RUNX2 (von engl. Runt- related transcription factor 2) (Fujita 2004; Hofmann et al. 2009; Deng et al. 2008; Karsenty 2000; Komori 2006; Teven et al. 2011; Phimpilai et al. 2006). Weitere klassische osteogene Differenzierungsmarker sind Osteocalcin, als Teil der nicht-kollagenen extrazellulären Knochenmatrix (Teven et al. 2011; Karsenty 2000; Hofmann et al. 2009; Collin et al. 1992), Bone Sialoprotein (BSP) (Karsenty 2000; Ganss et al. 1999) und die knochenspezifische Alkalische Phosphatase (ALP) (Collin et al. 1992). Die Expression und Bildung dieser Marker erfolgt zum Teil zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung. RUNX2 und Osteocalcin sind die beiden einzigen Faktoren, die spezifisch für Osteoblasten sind, das heißt für Zellen die zur Mineralisation der Extrazellulärmatrix befähigt sind (Hofmann et al. 2009). Maximale Bildung von Osteocalcin kann ab der Cluster-Formierung und der Mineralisation festgestellt werden (Collin et al. 1992). Für das Enzym der Alkalischen Phosphatase entdeckten Collin et. al an Zellen von Ratten zwei unterschiedliche Isoformen zu Beginn und zum Ende der Differenzierung (Collin et al. 1992).

2.3.2.2 Die adipogene Differenzierung

Die Induktion zur adipogenen Differenzierung erfolgt durch Zugabe von Dexamethason, Insulin, Isobutyl-methylxanthin und Indomethacin (Chamberlain et al. 2007). Dadurch kommt es zur Akkumulation von Lipidvakuolen in den Zellen. Diese Lipidvakuolen lassen sich zum Beispiel durch die Oil Red O Färbung darstellen (Chamberlain et al. 2007). Charakteristische adipogene Differenzierungsmarker wären PPAR- γ (von engl. Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Gamma), die Lipoprotein-Lipase und FABP (von engl. Fatty Acid Binding Protein) (Chamberlain et al. 2007; Teven et al. 2011).

2.3.2.3 Die chondrogene Differenzierung

Um die chondrogene Differenzierung zu induzieren werden Zellen in einer dreidimensionalen Pelletkultur verwendet und dem Kulturmedium wird klassischerweise der Wachstumsfaktor TGF- β (von engl. Transforming Growth Factor β) zugesetzt (Chamberlain et al. 2007). Die durch die chondrogene Differenzierung gebildeten Glukosaminoglykane können zum Beispiel mit Hilfe der Toluidinblau-Färbung visualisiert werden. Chondrogen differenzierte Zellen produzieren zudem unter Anderem Kollagen Typ II, welches typisch für Gelenkknorpel ist (Chamberlain et al. 2007).

2.3.3 Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks im Zusammenhang mit Osteoporose

Mesenchymale Stammzellen sind als primäre Quelle für osteogene Regeneration derzeit Gegenstand aktueller Osteoporoseforschung. Noch ist unklar, ob Veränderungen dieser Zellen zu Osteoporose führen und es existieren kontroverse Ergebnisse unterschiedlicher Studien. Dennoch konnten in verschiedenen Untersuchungen Veränderungen an MSC osteoporotischer Patienten festgestellt werden (Benisch et al. 2012; Nuttall et al. 1998; Rodriguez J.P. 2000; Rodriguez et al. 1999). Bislang wurde das Krankheitsbild Osteoporose mit Änderungen bezüglich des Differenzierungspotentials der Zellen, ihres Selbsterneuerungspotentials, ihrer

Proliferationskapazität und bezüglich zellulärer Seneszenz in Verbindung gebracht.

2.3.3.1 Veränderungen im Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen osteoporotischer Spender

Osteoporose ist gekennzeichnet durch ein Ungleichgewicht in der Knochen-Homöostase, bei der der Knochenabbau die neue Knochenformation übersteigt. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in Veränderungen des Differenzierungspotentials der MSC des Knochenmarks liegen. Verschiedene Studien haben sich demnach mit der Charakterisierung des Differenzierungspotentials von MSC osteoporotischer Spender beschäftigt. Rodriguez et. al stellten ein vermindertes osteogenes Differenzierungspotential bei MSC osteoporotischer Spender fest (Rodriguez et al. 1999). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass diese MSC in ihrer Extrazellulärmatrix weniger Kollagen Typ I bilden, was zu einer schlechteren Mineralisation der Matrix führt (Rodriguez J.P. 2000). Darüber hinaus konnte eine gesteigerte adipogene Differenzierungskapazität bei osteoporotischen MSC festgestellt werden (Rodriguez J.P. 2000). Der Knochenmasseverlust bei Osteoporose geht einher mit einem erhöhten Fettgehalt im Knochenmark. Eine erhöhte adipogene Differenzierungskapazität der MSC könnte in diesem Zusammenhang ein Hinweis für die zugrunde liegende Pathophysiologie sein. Auf Grundlage dieser Vermutung untersuchten Nuttall et. al humane Osteoblasten und bewiesen, dass ein bereits differenzierter Osteoblast zur adipogenen Differenzierung stimuliert werden kann (Nuttall et al. 1998). Die These der vermehrt adipogenen Differenzierungsausrichtung der MSC bei osteoporotischen Patienten wird auch durch Ergebnisse aus Tiermodell-Studien unterstützt. So stellten Kajkenova et. al bei SAMP6-Mäusen eine erhöhte Adipogenese im Knochenmark fest (Kajkenova et al. 1997). Bei ovariectomierten Ratten wurde ebenso ein wechselseitiges Verhältnis zwischen Fettgehalt des Knochenmarks und Knochenformationsrate ermittelt (Martin und Zissimos 1991).

Microarray-Analysen von MSC osteoporotischer Spender zeigten ebenso ein vermindertes osteogenes Differenzierungspotential durch verstärkte Transkription von Inhibitoren osteogener Signalwege (Benisch et al. 2012). Ebenso konnte in

dieser Studie von Benisch et. al eine verstärkte Expression von Faktoren für die Osteoklastogenese festgestellt werden (Benisch et al. 2012).

Dennoch wird die veränderte Differenzierungskapazität MSC als ursächlich für den Knochenmasseverlust bei Osteoporose kontrovers diskutiert. Justesen et. al konnten in einer Studie an MSC von Osteoporose-Patienten kein verändertes Differenzierungsverhalten im Vergleich zu MSC von gesunden Spendern feststellen (Justesen J. 2002). Ebenso konnten Stenderup et al. keine Unterschiede in der Formation mineralisierter Matrix zwischen MSC junger, alter und osteoporotischer Spender ermitteln (Stenderup et al. 2001).

2.3.3.2 Änderungen der Selbsterneuerungskapazität beziehungsweise des Proliferationspotentials mesenchymaler Stammzellen osteoporotischer Spender

In mehreren Untersuchungen zeigten MSC oder Osteoblasten osteoporotischer Spender eine verminderte Proliferationskapazität (Rodriguez et al. 1999; Kassem et al. 1997; Benisch et al. 2012). Die Funktion mesenchymaler Stammzellen ist die Reparatation und Aufrechterhaltung von Geweben. Eine reduzierte Anzahl an MSC kann zu einer Verminderung dieser Reparationsvorgänge führen und wird als möglicher Pathomechanismus für Osteoporose diskutiert (Benisch et al. 2012; Rodriguez et al. 1999). Hierzu konträr sind jedoch die Ergebnisse von Stenderup et. al, die keine verminderte Proliferationskapazität von MSC osteoporotischer Spender ermitteln konnten (Stenderup et al. 2001).

2.3.3.3 Osteoporose und zelluläre Seneszenz

Die Alterung des Stammzell-Pools im Knochenmark wird ebenso als möglicher Mechanismus für die Osteoporose-Entstehung diskutiert. An Osteoblasten osteoporotischer Spender konnten Zeichen zellulärer Seneszenz festgestellt werden (Kassem et al. 1997). Auch in Microarray-Analysen der Arbeitsgruppe Benisch et. al wurden auf Genexpressionsebene Anzeichen vorzeitiger Alterung bei MSC von Osteoporose-Patienten nachgewiesen. Zwar unterschieden sich die Genexpressionsmuster der MSC von osteoporotischen Spendern zu denen von gesunden alten Patienten, aber es gab einen Überlappungsbereich, in dem sich die Expressions-

muster ähnelten. Des Weiteren konnte die Expression sogenannter Seneszenz-Marker bei MSC der Osteoporose-Patienten belegt werden. Diese Ergebnisse implizieren, dass sich im Zuge einer Osteoporose die mesenchymalen Stammzellen in einem Zustand der vorzeitigen Alterung befinden (Benisch et al. 2012).

2.3.4 Charakterisierung MSC des Knochenmarks aus Tiermodellen für Osteoporose

Bislang wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark unterschiedlicher Tiermodelle charakterisiert, mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. Bei der Interpretation dieser Studien muss mit in Betracht gezogen werden, dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aufgrund von Spezies-Unterschieden und unterschiedlicher Induktion der Osteoporose sowie unterschiedlicher Isolierung und Kultivierung der MSC nur bedingt gegeben ist. Studien befassen sich mit MSC aus verschiedenen Spezies wie Maus, Ratte und Schaf (Fini et al. 2001; Torricelli et al. 2000a; Torricelli et al. 2000b; Zhou et al. 2001).

2.3.4.1 Charakterisierung MSC aus Tiermodellen für Seneszenz

Im Knochenmark der SAMP6-Maus, ein Modell für Alterungsprozesse und senile Osteoporose, zeigte sich eine drei- bis vierfach reduzierte Anzahl an MSC im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Anzahl an MSC, und damit eine reduzierte Osteoblastogenese, im Zusammenhang mit der verminderten Knochendichte bei diesen Tieren steht (Jilka et al. 1996). In gesunden Ratten mit einem hohen Lebensalter von 24 Monaten wurde ebenso eine reduzierte Anzahl an MSC im Knochenmark im Vergleich zu jüngeren Tieren festgestellt, allerdings war die Anzahl an MSC mit osteogenem Differenzierungspotential nicht verändert (Yue et al. 2005). Im Gegensatz dazu zeigten MSC alter Ratten in einer Studie von Asumda und Chase ein vermindertes Differenzierungspotential (Asumda und Chase 2011). Im Knochenmark von Mäusen mit einem Alter von 24 Monaten ist die Anzahl an MSC im Vergleich zu jungen Tieren von vier Monaten vermindert (Bergman et al. 1996). Wilson et. al zeigten an MSC alter Mäuse eine veränderte Genexpression im Vergleich zu jungen Tieren. Hierbei waren Expressionsmarker für die adipogene

Differenzierung erhöht und für die osteogene Differenzierung erniedrigt. Darüber hinaus wurden Wachstumsfaktoren und Regulatoren des Zellzyklus geringer exprimiert (Wilson et al. 2010).

2.3.4.2 Charakterisierung MSC aus Tiermodellen für Osteoporose

Die bislang häufigste Methode der Osteoporose-Induktion im Tiermodell ist die Ovariectomie. Die Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen aus solchen Modellen erfolgte an verschiedenen Spezies wie Mäusen, Ratten und Schafen.

Aus ovariectomierten Mäusen isolierte MSC des Knochenmarks zeigten eine niedrigere Expression osteogener Differenzierungsmarker nach osteogener Stimulation als Zellen gesunder Kontroll-Tiere (Zhou et al. 2001). Die Ovariectomie dieser Mäuse resultierte in einer verminderten osteogenen Differenzierungskapazität ihrer MSC im Knochenmark (Zhou et al. 2001).

In einer Studie an MSC von Schafen konnten unter Standardbedingungen keine Unterschiede zwischen MSC von ovariectomierten Tieren und Kontroll-Tieren ermittelt werden (Torricelli et al. 2000a). Allerdings zeigten sich Unterschiede in Anwesenheit eines *in vitro* zu testenden Biomaterials. MSC der ovariectomierten Schafe zeigten bei Kultivierung auf dem Biomaterial eine niedrigere Proliferationsrate, sowie eine verminderte Sekretion von Osteocalcin bei osteogener Stimulation und eine veränderte Morphologie (Torricelli et al. 2000a).

Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen an MSC ovariectomierter Ratten, unter Standardbedingungen zeigten sich keine Unterschiede zu MSC gesunder Ratten (Torricelli et al. 2000b; Fini et al. 2001). Jedoch bei Kultivierung auf einem Biomaterial wiesen die MSC ovariectomierter Ratten einer verminderten Viabilität und Osteocalcin-Sekretion auf (Torricelli et al. 2000b). Diese Erkenntnisse bezüglich des veränderten Verhaltens der Stammzellen in Anwesenheit von Biomaterialien sind von großem Interesse, da die Testung neuer Biomaterialien *in vitro* vor der Testung *in vivo* immer mehr an Bedeutung gewinnt. Hierdurch können im Vorfeld klinischer Studien *in vivo* wichtige Erkenntnisse über die Biokompatibilität eines Materials gewonnen und so Tierversuchszahlen minimiert werden (Torricelli et al. 2000b; Torricelli et al. 2000a).

Es wurden auch bereits mesenchymale Stammzellen aus Knockout-Modellen für Osteoporose charakterisiert, so entwickelt die Sca-1 Knock-Out Maus einen Kno-

chenmasseverlust, der aufgrund der verminderten Selbsterneuerungskapazität der MSC des Knochenmarks auftritt (Bonyadi et al. 2003).

2.3.4.3 Vergleich MSC des Menschen mit MSC aus Tiermodellen

In einer Studie von Torricelli et. al wurden Charakteristika mesenchymaler Stammzellen von Mensch, Ratte und Schaf verglichen, wobei die größten Unterschiede zwischen Mensch und Ratte festgestellt wurden (Torricelli et al. 2003). Die Vergleichbarkeit von Untersuchungsergebnissen ist durch Spezies-Unterschiede und Unterschiede in Isolierungs- und Kultivierungsverfahren limitiert. Daher ist es für die Evaluation von Ergebnissen wichtig, diese Unterschiede zu kennen und genauer zu charakterisieren, insbesondere im Kontext von Überprüfungen neuer Biomaterialien und pharmakologischer Substanzen in Zellkulturstudien (Torricelli et al. 2003).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

Untersucht wurden die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark von Humerus und Hüftbein von insgesamt 30 Ratten. Die Ratten entstammten dem Teilprojekt T1 „Etablierung und Qualitätssicherung osteoporotischer Tiermodelle“ des Sonderforschungsbereich/Transregio 79 „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“.

3.1.2 Das Tiermodell

Im Rahmen des Teilprojekts T1 „Etablierung und Qualitätssicherung osteoporotischer Tiermodelle“ des Sonderforschungsbereich/Transregio 79 wurden verschiedene Arten der Osteoporose-Induktion im Kleintiermodell Ratte untereinander verglichen. Ziel hierbei war, ein mit der humanen Osteoporose vergleichbares, standardisiertes Tiermodell zu etablieren.

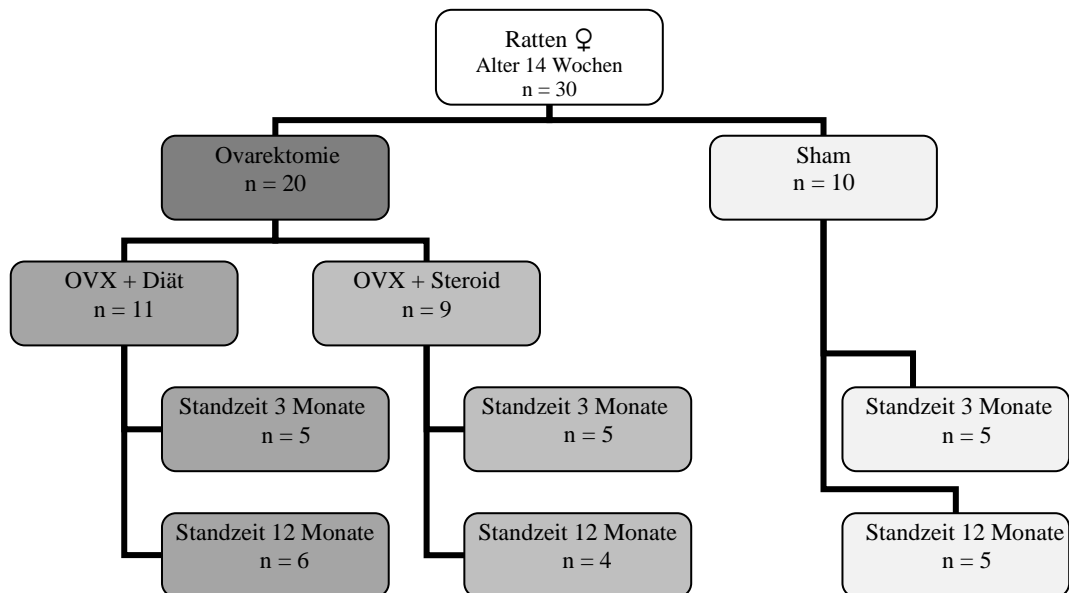
Die Induktion der Osteoporose wurde auf zwei unterschiedliche Arten vollzogen: Zum Einen durch Ovariectomie und Gabe einer Calcium-defizitären Diät¹ (im Folgenden „OVX + Diät“ genannt). Zum Anderen durch Ovariectomie in Kombination mit der Gabe eines Steroids² (im Folgenden „OVX + Steroid“ genannt). Die Probenentnahme erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Standzeiten): Drei Monate (drei Monate Standzeit) und zwölf Monate (zwölf Monate Standzeit) nach der Ovariectomie. Die Gabe der Diät beziehungsweise des Steroids erfolgte demnach über drei und zwölf Monate. Zu jeder Standzeit wurden zusätzlich als Kontrolle scheinoperierte Ratten etabliert (nachfolgend „Sham“ genannt). Alle Ratten waren weiblich und vom Typ Sprague Dawley und wurden im Alter von 14 Wochen ovariectomiert beziehungsweise scheinoperiert.

¹ Mangel an Vitamin D2/ D3, Vitamin K, Calcium, Sojafrei, Phytoöstrogenfrei, knappe Phosphorversorgung

² Dexamethason

Die Abbildung 1 zeigt den Versuchsaufbau für das Tiermodell inklusive der jeweiligen Stichprobenanzahlen.

Abbildung 1: Das Tiermodell



3.1.3 Verwendete Medien und Reagenzien für die Zellkultur

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Alpha Minimum Essential Medium (αMEM)	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DMEM)	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
FBS GOLD	PAA, Pasching, Österreich
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen, Deutschland
Indomethacin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutsch- land
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutsch- land
PBS, phosphate buffered saline	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Red Cell Lysis Buffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutsch- land
β - Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutsch- land

3.1.4 Verwendete Reagenzien für histologische Färbungen

Formalin (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Instant Hematoxylin	Thermo Fischer Scientific, USA
Höchstfarbstoff	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
Kaiser Gelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Carbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Oil Red O	Chroma Gesellschaft Schmid und Co., Stuttgart- Untertürkheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phalloidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutsch- land
Pro Long antifade reagent	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Triton X	Calbiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland
----------	--

3.1.5 Verwendete Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen

5 x DNA Loading Buffer	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Agar- Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
AmpliTaq GOLD	Roche, Mannheim, Deutschland
DNase I	Roche, Mannheim, Deutschland
DNase I Incubation buffer	Roche, Mannheim, Deutschland
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gel Green TM Nucleic acid stain	Biotium, über VWR, Darmstadt, Deutschland
GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Glycogen	Roche, Mannheim, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD TriFast TM Reagent	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
Quantitas DNA Marker 50 bp-2 kb	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

6-Well/ 24-Well Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-well Platten für ELISA Reader	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Culture Insert	Ibidi, Planegg / Martinsried, Deutschland
Deckgläser 13 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Falcon Zentrifugenröhrchen 50 ml, 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filter 70 µm	BD Falcon, Belgien
Glaspipetten	Hischmann, Eberstadt, Deutschland
Hard-Shell® PCR Platten 96 well	Bio-Rad, München, Deutschland
Kanüle 21G	Braun, Melsungen, Deutschland
Kryoröhrchen 1,5 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Küvetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Microseal® B Film PCR Sealer	Bio-Rad, München, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Probenbecher 100 ml	VWR, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße 2 ml, 1,5 ml, 650 µl	Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
Spritze 10 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschale 35x10 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

3.1.7 Geräte

-20 °C Gefrierschrank	Liebherr, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CFX96 Touch™ Real- Time PCR Detection System	Bio-Rad, München, Deutschland
Cryo- Einfriergerät „Mr. Frosty“	Nalgene® über Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ELISA Reader Tecan Sunrise™	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Feinwaage „Discovery“	OHaus, Nänikon, Schweiz
Gefrierschrank -86°C Heraeus Hera-freeze	Thermo Fischer Scientific, USA
Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Axio Observer.Z1, Temp Module S, CO2 Module S	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GMBH & CO. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
Pentra 400	ABX Diagnostics über Axon Lab AG, Stuttgart, Deutschland
Pipettus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Power Pac™ Basic	Bio-Rad, München, Deutschland
Sterilbank Zellkultur „MSC advance“	Thermo Fischer Scientific, USA
Stickstofftank Thermolyne	Thermo Fischer Scientific, USA
Thermocycler „DNA-Engine“	Bio-Rad, München, Deutschland
Transilluminator UVsolo	Biometra, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	MEMMERT GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad Zellkultur	Gesellschaft für Laborgeräte, Burgwedel, Deutschland
Zellkultur Brutschrank “Sanyo Co2 Incubator”	Sanyo, München, Deutschland
Zentrifuge “Megafuge 11R Heraeus”	Thermo Scientific, USA
Zentrifuge „Mikro 20“	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge „Mikro 220R“	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

3.1.8 Software

Photoshop cs5	Adobe systems, USA
Bio-Rad CFX Manager Software 2.0	Bio-Rad, München, Deutschland
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corporation, USA

Axiovision image analysis

Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

Citavi

Swiss Academic Software GmbH,
Schweiz

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Isolierung der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark

Der linke Humerus und das linke Hüftbein der Ratten wurden unmittelbar nach der Explantation sorgfältig von Muskulatur und umgebendem Weichteilgewebe freipräpariert und in kalter phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) (Gibco life technologies) mit Heparin-Natrium (Braun) in einer Endkonzentration von fünf U/ml für den Transport in das Zellkulturlabor zwischengelagert. Unter der Sterilbank des Zellkulturlabors wurden die Knochen an den Enden aufgeschnitten. Daraufhin wurde das Knochenmark mit Hilfe einer 21G Kanüle (Braun) und einer 10 ml Spritze (Braun) mit Alpha Minimum Essential Medium (α MEM Medium) (Gibco life technologies) in einen Probenbecher ausgespült. Die daraus resultierende Suspension von Medium und Knochenmark wurde anschließend durch einen 70 μ m Filter (BD Falcon) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) filtriert und daraufhin bei 250 g für fünf Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde im Folgenden zweimal mit PBS gewaschen mit jeweils zwei entsprechenden Zentrifugationsschritten bei 250 g für fünf Minuten. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 500 μ l Red Cell Lysis Buffer (Sigma) gelöst und sieben Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgte eine erneute Zentrifugation bei 250 g für fünf Minuten und das Zellpellet wurde wiederum zweimal mit PBS gewaschen mit je zwei Zentrifugationen bei 250 g für fünf Minuten. Das nun gewonnene Zellpellet wurde in einem Milliliter α MEM Medium mit 20 % fötalem bovines Serum (FBS) (PAA) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) (Gibco life technologies) (im Folgenden als Wachstumsmedium bezeichnet) gelöst, in ein Well einer 6-well Zellkulturplatte (Greiner bio-one) ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.2 Kultivierung und Subkultivierung der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark

Die gewonnenen mesenchymalen Stammzellen (MSC, mesenchymal stem cells) aus dem Knochenmark der Ratten wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle drei Tage wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Wachstumsmedium (α MEM, 20 % FBS, 1 % P/S) gewechselt. Sobald die Zellen in der Zellkulturschale eine etwa 80-prozentige Konfluenz erreichten, wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Milliliter Accutase (PAA) bei 37 °C im Brutschrank für fünf Minuten inkubiert. Nach einer mikroskopischen Kontrolle ob sich die Zellen schon vollständig vom Boden der Zellkulturschale gelöst haben wurde die Reaktion durch Zugabe von zwei Millilitern Wachstumsmedium abgestoppt. Die gewonnene Suspension von gelösten Zellen und Medium wurde mit einer Glaspipette (Hirschmann) aufgesaugt, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt und bei 800 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem gewonnenen Zellpellet wurde daraufhin mit einer Glaspipette abgenommen und das Zellpellet wurde dann in einem Milliliter Wachstumsmedium gelöst. Die Zellzahl wurde mittels Zellzählung in der Neubauer Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden daraufhin in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner bio-one) mit einer Dichte von 10 000 bis 15 000 Zellen/cm² ausplattiert.

3.2.1.3 Kryokonservierung der MSC

Zur längerfristigen Lagerung der MSC und um ein Durchführen der Versuche in einheitlichen Passagen der Zellen zu ermöglichen wurde die Kryokonservierung genutzt. Sobald die MSC in den 75 cm² Zellkulturflaschen Konfluenz erreichten, wurden sie zur Kryokonservierung mit Accutase abgelöst wie in 3.2.1.2 beschrieben. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml in Einfriermedium gelöst und in 1,5 ml Kryoröhrchen (Carl Roth) überführt. Das Einfriermedium bestand aus α MEM Medium mit 30 % FBS und 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (AppliChem). Die Zellen wurden dann zunächst über Nacht bei -80 °C in dem Cryo 1 °C Freezing Container „Mr. Frosty“ (Nalgene) gelagert um eine kritische, wiederholbare

Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C / Minute zu erreichen. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei –196 °C aufbewahrt. Alle Zellen wurden somit in der Passage eins kryokonserviert.

3.2.1.4 Auftauen der MSC

Zum Auftauen der MSC wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C für 20 bis 30 Sekunden angetaut. Unter der Zellkulturbank wurden die Zellen bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Wachstumsmedium (α MEM, 20 % FBS, 1 % P/S) überführt. Im Folgenden wurden die Zellen bei 800 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand über dem gewonnenen Zellpellet mit einer Glaspipette abgenommen und das Zellpellet in einem Milliliter Wachstumsmedium gelöst. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 10 000 bis 15 000 Zellen pro cm² in 75 cm² Zellkulturflaschen ausplattiert.

Die Zellen wurden nun in der zweiten Passage für drei bis sieben Tage kultiviert um die Zellzahl zu erhöhen. Für alle Experimente wurden MSC der dritten Passage genutzt.

3.2.1.5 Osteogene Differenzierung

3.2.1.5.1 Vorversuche zur osteogenen Differenzierung: Ermittlung der geeigneten Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums für die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark der Ratte

Vor Beginn der Untersuchungen wurde zunächst an MSC der Kontroll-Gruppe (Sham) die geeignete Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums getestet. Die untersuchten Differenzierungsmedien unterschieden sich in ihrer Zusammensetzung bezüglich des Basismediums, das heißt ob α MEM oder Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DMEM) (Gibco life technologies) genutzt wurde, und bezüglich der Konzentrationen der zugesetzten Differenzierungsfaktoren. Die exakten Zusammensetzungen der getesteten Differenzierungsmedien sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Vorversuche zur osteogenen Differenzierung: Getestete Differenzierungsmedien

Nr.	Basis-medium	FBS	P/S	Ascorbinsäure	β-Glycerolphosphat	Dexamethason	CaCl ₂
1	αMEM	10 %	1 %	50 µg/ml	5 mM	1 nM	–
2	αMEM	10 %	1 %	0,3 mM	10 mM	100 nM	2,2 mM
3	DMEM	10 %	1 %	0,3 mM	10 mM	100 nM	-
4	DMEM	10 %	1 %	0,3 mM	10 mM	100 nM	2,2 mM

Die osteogene Stimulation der Zellen wurde nach der 14-tägigen Differenzierung histologisch mittels von Kossa Färbung überprüft.

3.2.1.5.2 Durchführung der osteogenen Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden die MSC mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/cm² in 6-well- und 24-well Zellkulturplatten (Greiner bio-one) ausplattiert und zunächst in Wachstumsmedium (αMEM, 20 % FBS, 1 % P/S) kultiviert. Sobald die Zellen in den Zellkulturplatten eine 80-prozentige Konfluenz erreichten wurde das Wachstumsmedium gegen osteogenes Differenzierungsmedium gewechselt. Das osteogene Differenzierungsmedium bestand, wie in den Vorversuchen in Tabelle 1 Nummer 4 beschrieben, aus Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DMEM), 10 % FBS, 1 % P/S, 0,3 mM Ascorbinsäure (Sigma), 10 mM β-Glycerolphosphat (Sigma), 100 nM Dexamethason (Sigma) und 2,2 mM CaCl₂ (Sigma). Parallel wurden zu jedem Versuch zwei Negativkontrollen mitgeführt, und zwar Zellen in Basismedium für die Differenzierungen (DMEM, 10 % FBS, 1 % P/S) mit (Negativkontrolle 1, NC1) oder ohne die Zugabe von 2,2 mM CaCl₂ (Negativkontrolle 2, NC2). Die osteogene Stimulation erfolgte über 14 Tage, alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel nach einem vorhergehenden Waschschriff mit PBS durchgeführt.

3.2.1.5.3 Messung des Calcium-Gehaltes der Kulturen

Für die Messung des Calciumgehalts wurden die Zellen in den 24-well Zellkulturplatten verwendet. Nach mehrmaligem gründlichen Waschen der Zellen mit

Aqua bidest wurden die Zellen mit 300 µl siebenprozentiger Essigsäure (Merck) pro well lysiert. Hierfür wurde durch mehrmaliges Abspülen des Zellkulturplattenbodens mit der Essigsäure sichergestellt, die gesamte Menge an Zellen und eventuell gebildeter Calcium-haltiger extrazellulärer Matrix abzulösen. Diese Lösung wurde daraufhin in 2 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt) überführt. Die Messung des Gesamt-Calciumgehaltes erfolgte im Zentrallabor der Klinik für Kleintiere der Justus Liebig Universität Gießen mittels Pentra 400 (Axon Lab AG). Es wurden für jede untersuchte Zellkultur je zwei Wells mit Zellen für jedes verwendete Medium lysiert, das heißt zwei Wells mit Zellen die osteogenes Differenzierungsmedium (OD) erhielten sowie je zwei Wells für die Negativkontrollen NC1 und NC2. Um mögliche Fehler in der Messung durch das dem Medium zugesetzt CaCl_2 zu vermeiden, wurde von dem gemessenen Calciumgehalt der osteogen differenzierten Zellen der Calciumgehalt, der in den Negativkontrollen 1 gemessen wurde, abgezogen.

Die statistische Analyse erfolgte mittels drei- und zweifaktorieller Varianzanalysen. Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der Calcium-Werte wurden die Daten, wie in diesem Fall üblich, zuvor logarithmisch transformiert.

3.2.1.5.4 Herstellung von Zelllysaten mit peqGOLD TriFast™ für die spätere RNA-Isolierung

Die Zellen, die in den 6-well Zellkulturplatten für die osteogene Differenzierung kultiviert wurden, wurden mittels peqGOLD TriFast™ Reagent (peqlab) für die spätere Isolierung der RNA lysiert. Je Well wurden 1000 µl peqGOLD TriFast™ Reagent zur Lyse eingesetzt. Das Lysat wurde daraufhin in 1,5 ml Kryoröhrchen überführt und bis zur Isolation in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

3.2.1.6 Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung wurde exemplarisch an mindestens einem Tier pro Gruppe durchgeführt um das Differenzierungspotential der MSC in verschiedene Richtungen, das heißt sowohl osteogen als auch adipogen, zu überprüfen.

Für die adipogene Differenzierung wurden die MSC in 24-well Zellkulturplatten in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/cm² ausplattiert und zunächst in Wachstumsmedium kultiviert (α MEM, 20 % FBS, 1 % P/S). In die Zellkulturplatten wurden zuvor sterile Deckgläser (Carl Roth) mit einem Durchmesser von 13 mm gebracht, um eine spätere Färbung der Zellen auf Glas zu ermöglichen. Sobald die Zellen eine 80-prozentige Konfluenz erreichten, wurde das Wachstumsmedium durch adipogenes Differenzierungsmedium ersetzt. Das adipogene Differenzierungsmedium bestand aus DMEM mit 10 % FBS, 1 % P/S, 1 μ M Dexamethason, 5 μ g/ml Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) (Sigma), 0,2 mM Indomethacin (Sigma) und 0,5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma). Als Negativkontrolle wurden jeweils ein Teil der Zellen mit Basismedium für die Differenzierungen inkubiert (DMEM, 10 % FBS, 1 % P/S). Die adipogene Stimulation erfolgte über 14 Tage, alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel nach einem vorhergehenden Waschschrift mit PBS durchgeführt.

3.2.1.7 MTT Test

Um die Proliferationskapazität der MSC zu überprüfen wurde der MTT Test genutzt. Hierfür wurden die Zellen in einer definierten Zellzahl von 15 000 Zellen/cm² in 24-well Zellkulturplatten in Wachstumsmedium (α MEM, 20 % FBS, 1 % P/S) ausplattiert. Die examinieren Zeitpunkte waren zu null Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden. Um den Zeitpunkt Null zu bestimmen wurden 28 500 Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt) pipettiert, 28 500 Zellen entspricht der Zellzahl pro well einer 24-well Zellkulturplatte wenn die Dichte von 15 000 Zellen / cm² eingesetzt wird. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde das Wachstumsmedium (α MEM, 20 % FBS, 1 % P/S) durch Wachstumsmedium mit 0,5 mg des gelben Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) (Sigma) pro ml Medium ersetzt und die Zellen für weitere vier Stunden im Zellkulturbrutschrank inkubiert.

Bei der Bestimmung des Zeitpunktes zu null Stunden wurden die Zellen direkt in Wachstumsmedium mit MTT in die Reaktionsgefäße überführt und für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach den vier Stunden Inkubationszeit wurde das MTT Medium von den Zellen abgesaugt und verworfen. Hierfür wurden die Zellen in den Reaktionsgefäßen im Falle des Zeitpunktes zu null Stunden zuvor

bei 800 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, um die Zellen als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Im nächsten Schritt wurden nun auf die Zellen 200 µl DMSO (AppliChem) gegeben und für zehn Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss daran wurde die nun violette Lösung in 96-well Platten überführt und die Absorption bei 570 nm am ELISA-Reader Tecan SunriseTM gemessen. Zur Fehlerkorrektur wurden je Zeitpunkt und Probe jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt und durch den gemessenen Blank-Wert korrigiert.

Die Methode zur Bestimmung der Proliferationskapazität beruht darauf, dass in vitalen Zellen der aufgenommene gelbe Farbstoff MTT in ein violettes, wasserunlösliches Formazan reduziert wird. Durch die Messung der Absorption im ELISA-Reader kann auf die Anzahl vitaler Zellen rückgeschlossen werden.

Zur statistischen Analyse wurde der Proliferationsfaktor als Quotient aus der Absorption nach 48 Stunden und der Absorption nach Null Stunden errechnet.

$$\text{Proliferationsfaktor (MTT)} = \frac{y(48h)}{y(0h)}$$

Durch diese Rechnung wurden zudem eventuelle Schwankungen in der Anfangszellzahl minimiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse.

3.2.1.8 Migration

Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit der MSC wurde ein „Life-Cell Imaging“ über mindestens 36 Stunden mit den Zellen durchgeführt. Um die Migration der Zellen über einen definierten Zell-freien Bereich beurteilen zu können wurde das Culture Insert von ibidi® verwendet. Das Insert wurde mit seiner klebenden Unterseite am Boden einer 35 x 10 mm Zellkulturschale (Greiner bio-one) befestigt und die MSC wurden in Wachstumsmedium (αMEM, 20 % FBS, 1 % P/S) in einer definierten Zellzahl von 35 000 Zellen je well des Inserts ausplattiert. Nach 24 Stunden waren die Zellen vollständig am Boden der Zellkulturschale adhärirt und das Insert wurde vorsichtig mit einer sterilen Pinzette aus der Schale entfernt. Die Zellkulturschale wurde danach mit drei Millilitern Wachstumsmedium aufgefüllt. Durch das Culture Insert resultierte eine Zell-unbedeckte Fläche zwischen

den Zellfeldern von konstant 500 µm. Das „Life-Cell Imaging“ wurde mittels Axio Observer Z1 Mikroskop von Zeiss mit dazugehörigem Temperatur und CO₂ Modul bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Aufnahmen der Zellen erfolgten alle zehn Minuten über mindestens 36 Stunden, beziehungsweise bis die Zellen den Zell-unbedeckten Spalt vollständig bewachsen hatten.

Die Auswertung der Mikrofotographien erfolgte mittels Adobe Photoshop cs5 Software durch Errechnung der Zell-unbedeckten Fläche in Prozent über die Zeit.

Für die statistische Beurteilung der Migrationskapazität wurde für jede Verlaufsmessung pro Tier das Maß für die Geschwindigkeit der Migration berechnet. Hierfür wurde als mathematisches Modell die logistische Gleichung in der folgenden Form angepasst:

$$y(t) = \frac{A}{1 + e^{-(a+bt)}}$$

Die logistische Modellgleichung enthält nachfolgende Parameter:

$y(t)$: Migrationskapazität zum Zeitpunkt t

A : Ausgangswert

e : Eulersche Zahl

a : weiterer Parameter des logistischen Modells; Position der Kurve entlang der x- Achse

b : Steigungsmaß für die Gleichung, somit Maß für die Geschwindigkeit

Die Variable b diente somit als Maß für die Geschwindigkeit und ging in die statistische Berechnung in der zweifaktoriellen Varianzanalyse ein.

3.2.2 Histologische Färbungen

3.2.2.1 Von Kossa Färbung

Um die Bildung calciumhaltiger extrazellulärer Matrix der Zellen durch osteogene Stimulation histologisch zu dokumentieren, wurde die von Kossa Färbung durchgeführt.

Für die von Kossa Färbung wurden die Zellen in den 24-well Zellkulturplatten genutzt. Es wurden für jeden Versuchsansatz je zwei Wells pro angewendetem

Medium angefärbt, demnach zwei Wells, die mit osteogenem Differenzierungsmedium, zwei Wells, die mit Basismedium für die Differenzierungen mit CaCl_2 und zwei Wells, die mit Basismedium ohne CaCl_2 über 14 Tage inkubiert worden waren. Die Zellen wurden zweimal vorsichtig aber gründlich mit Aqua bidest gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen für zehn Minuten mit 4 % Formalin (Carl Roth) in Bidest fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Aqua bidest wurden die nun fixierten Zellen für 30 Minuten in fünfprozentiger Silbernitratlösung (Carl Roth) unter Einfluss von Tageslicht inkubiert. Im Anschluss daran wurde wiederum zweimal mit Aqua bidest für fünf Minuten gewaschen bevor die Zellen in frisch filtrierter fünfprozentiger Natrium-Carbonat-Formaldehydlösung (Merck) für fünf Minuten inkubiert wurden. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Aqua bidest für je fünf Minuten wurden die Zellen mit Farmer's Reducer bestehend aus zehnprozentiger Natriumthiosulfatlösung und zehnprozentiger Formaldehydlösung für dreißig Sekunden benetzt. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit Aqua bidest für fünf Minuten gewaschen und danach für fünf Minuten mit Kernechtrot (Merck) inkubiert. Schlussendlich wurden die Zellen mit Aqua bidest mehrfach gründlich gewaschen und in Kaiser Gelatine (Merck) mit Deckgläsern mit einem Durchmesser von 13 mm eingedeckt.

Ansetzen der Lösungen:

5% Silbernitrat: 5g Silbernitrat (Carl Roth) auf 100 ml Aqua bidest

5 % Na-Carbonat-Formaldehyd: 5 g Na-Carbonat (Merck) in 25 ml 35-40% iger Formaldehyd und 75 ml Aqua bidest lösen

Farmers Reducer: 10% Na-Thiosulfat: 2 g Na-Thiosulfat-Pentahydrat in 20 ml Aqua bidest lösen, mit 1 ml 10% iger Formaldehydlösung mischen

Kernechtrot: 0,1 g Kernechtrot (Merck) in 100 ml kochender 5 % iger Aluminiumsulfatlösung lösen, nach dem Erkalten filtrieren.

3.2.2.2 Oil Red O Färbung

Zur histologischen Darstellung der Fettvakuolen in den undifferenzierten MSC sowie in den adipogen differenzierten Kulturen wurde die Oil Red O Färbung genutzt.

Zunächst wurden die Zellen zweimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen um danach für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit vierprozentigem Paraformaldehyd fixiert zu werden. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal für jeweils fünf Minuten mit destilliertem Wasser (Aqua dest) gewaschen. Im Anschluss daran folgte die Inkubation in frisch filtrierter Oil Red O (Chroma Gesellschaft Schmid und Co.) Gebrauchslösung für 15 Minuten im Dunkeln. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Aqua dest. folgte die Inkubation mit frisch filtriertem Hämatoxylin nach Mayer (Thermo Scientific) für 15 Sekunden. Daraufhin wurden die Proben für etwa zehn Minuten in warmem Leitungswasser gebläut, wobei das Leitungswasser alle zwei Minuten erneuert wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit Aqua dest wurden die Deckgläser aus den Zellkulturplatten entnommen und mit Kaiser Gelatine auf Objekträgern eingedeckt.

Ansetzen der Lösungen:

Oil Red O Stammlösung: 100 ml 99%iges Isopropanol (auf 60 °C erwärmt)

0,5 g Oil Red O

Oil Red O Gebrauchslösung: 30 ml Stammlösung + 20 ml Aqua dest.

Instant Hematoxylin (Thermo Scientific) laut Herstellerangaben.

3.2.2.3 Phalloidin Färbung

Zur Darstellung des Aktinzytoskeletts der MSC wurde die Phalloidin Färbung an MSC, die nach drei Monaten Standzeit isoliert wurden, angewendet. Hierzu wurden die Zellen in 24-well Zellkulturplatten auf sterile Deckgläser mit einem Durchmesser von 13 mm in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ cm^2 ausplattiert. Nach Erreichen einer 80-prozentigen Konfluenz wurden die MSC zunächst zweimal für drei Minuten mit PBS gewaschen und dann für 20 Minuten mit vierprozentiger Paraformaldehydlösung fixiert. Daraufhin wurden die Zellen nach erneutem Waschen mit PBS in 1-prozentigem Triton X in 1 x Tris-gepufferter Salzmischung (TBS) für zehn Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurden die MSC wiederum dreimal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in 1-prozentigem FBS in PBS inkubiert. Daraufhin folgte die Inkubation mit einer 2,5-prozentigen Phalloidinlösung (Sigma-Aldrich) für 30 Minuten und vor Licht geschützt. Im Folgenden wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die

Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels Höchst-Farbstoff (0,05 % in TBS) (Invitrogen) für fünf Minuten. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser aus der Zellkulturplatte entnommen und mit Pro Long GOLD antifade reagent (Invitrogen) auf Objektträgern eingedeckt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C und vor Licht geschützt.

Ansetzen der Lösungen:

TBS Puffer Stammlösung: 60,5 Tris Base (Carl Roth), 900 ml Aqua bidest, pH 7,6 mit konzentrierter Salzsäure einstellen, 90g NaCl

Waschpuffer: 100 ml Stammlösung + 900 ml Aqua dest. + 250 µl Triton X

3.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.3.1 RNA Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte mit peqGOLD TriFast™ Reagent (peqlab) laut Protokoll des Herstellers. Zu Beginn wurde den Zelllyaten mit peqGOLD TriFast™ Reagent zur Verbesserung der Ausbeute nach dem Auftauen 12,5 µl Glycogen (Roche) pro Milliliter zugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Isolierung wurde die Konzentration der gewonnenen RNA sowie deren Reinheit am BioPhotometer (Eppendorf) bei 260 nm überprüft. Die RNA wurde bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Vor der weiteren Nutzung der RNA wurde die Konzentration einheitlich auf 200 ng/µl eingestellt.

3.2.3.2 cDNA-Synthese: Qualitative Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

In der Reversen-Transkriptions-Polymerasen-Kettenreaktion (RT-PCR) wird durch reverse Transkription die extrahierte mRNA in DNA, sogenannte *copyDNA* (cDNA) umgeschrieben. Um eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA zu verhindern wird zuvor die mRNA einer Behandlung mit DNaseI (Roche) unterzogen. Für die nachfolgende RT-PCR wurde das GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems®) genutzt und wurde laut Herstelleran-

gaben durchgeführt. Im Folgenden ist die Mastermix-Zusammensetzung für den DNase Verdau aufgeführt:

Tabelle 2: Mastermix DNase Verdau

Kit/ Hersteller	Reagenz	1 x Ansatz
GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems®)	25 mM MgCl ₂	1,2 µl
Roche	10 x DNase I incubation buffer	1,2 µl
Roche	10 U/µl DNase I, RNase frei	1,2 µl
Roche	40 U/µl RNase Inhibitor	0,3 µl

Zu 3,9 µl des DNase-Mastermixes wurden 8,1 µl der auf 200 ng/µl eingestellten mRNA zugegeben. Der Ansatz wurde danach nach folgendem Programm im Thermocycler „DNA-Engine“ (Bio-Rad) inkubiert:

1. 35 Minuten bei 37 °C
2. 10 Minuten bei 75 °C
3. Abkühlen auf 4 °C

Die RNA wurde nach der DNase Behandlung unverzüglich in der RT-PCR weiterverwendet, um die Stabilität der RNA sicher zu gewährleisten. Im Folgenden ist die Mastermix-Zusammensetzung für die RT-PCR aufgeführt:

Tabelle 3: Mastermix RT-PCR

Kit	Reagenz	1 x Ansatz
GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems®)	25 mM MgCl ₂	2,0 µl
	10 x PCR GOLD Puffer	1,0 µl
	Nukleotide MIX (dNTP)	4,0 µl
	50 µM Random Hexamers	0,5 µl
	20 U/µl RNase- Inhibitor	0,5 µl
	50 U/µl Reverse Transkriptase	0,5 µl

Zu 51 µl des RT-PCR-Mastermixes wurden 9 µl der DNase-behandelten RNA zugegeben.

Zusätzlich wurde zu jeder Probe ein kleinerer Ansatz ohne Zugabe der Reversen Transkriptase durchgeführt, um den Erfolg des DNase Verdau zu überprüfen (nachfolgend –RT-Kontrolle genannt). Hierfür wurde die Reverse Transkriptase durch steriles Aqua bidest ersetzt. Nach einem erfolgreichen DNase Verdau ist in einer nachfolgenden Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) in der –RT-Kontrolle kein Signal zu detektieren, da weder cDNA noch genomische DNA in der Probe enthalten sein können. Falls in der –RT-Kontrolle ein Signal zu detektieren ist, ist die Probe mit genomischer DNA kontaminiert und der DNase Verdau muss wiederholt werden.

Der Ansatz wurde im Thermocycler laut folgendem Programm inkubiert:

1. 8 Minuten bei 21 °C
2. 15 Minuten bei 42 °C
3. 5 Minuten bei 99 °C
4. 5 Minuten bei 5 °C
5. Abkühlen auf 4 °C

Bis zur weiteren Nutzung wurde die gewonnene cDNA bei –20 °C gelagert.

3.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die synthetisierte cDNA und die –RT-Kontrolle zu überprüfen wurde eine PCR mit dem Primer für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) an allen Proben durchgeführt. In den nachfolgenden Tabellen ist der hierfür genutzte Primer sowie die Mastermix-Zusammensetzung für die PCR aufgeführt:

Tabelle 4: Primersequenz *Gapdh*

Primer	Nukleotidsequenz	Produktgröße
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh)	Forward: 5'-GCGTGAACCACGAGAAATATGA-3'	62 bp
	Reverse: 5'-GGTGGTGCAGGAGGCATT-3'	

Tabelle 5: Mastermix PCR

Kit/ Hersteller	Reagenz	1 x Ansatz
GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems®)	25 mM MgCl ₂	0,5 µl
	10 x PCR GOLD Puffer	1 µl
Eurofins MWG Operon	10 pmol/µl Primer Gapdh forward	0,25 µl
Eurofins MWG Operon	10 pmol/µl Primer Gapdh reverse	0,25 µl
	Aqua bidest	7,93 µl
Roche	AmpliTaq GOLD	0,0625 µl

Zu 10 µl des Mastermixes wurden 2,5 µl der cDNA beziehungsweise der –RT-Kontrolle zugefügt, gemischt und bei folgendem Programm im Thermocycler inkubiert:

1. 10 Minuten bei 95 °C
2. 1 Minute bei 94 °C
3. 1 Minute bei 60 °C
4. 1,5 Minuten bei 72 °C

Wiederholung der Schritte 2 bis 4 in 34 Zyklen

5. 10 Minuten bei 72 °C
6. Abkühlen auf 4 °C

Die gewonnenen PCR-Produkte wurden bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.2.3.4 Gelelektrophorese

Zur visuellen Kontrolle des PCR-Produkts wurde die Gelelektrophorese genutzt. Hierzu wurde ein zweiprozentiges Agarosegel mit dem Farbstoff Gel GreenTM Nucleic Acid Stain (Biotium) verwendet. Es wurden 50 ml 1 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (1x TAE-Puffer) mit einem Gramm Agar-Agar (Roth) vermischt, in der Mikrowelle aufgekocht, mit 5 µl des Farbstoffs Gel GreenTM vermischt und in einen Gelträger gegossen. Nach Aushärtung wurde das Gel in die Laufkammer

(Biometra) mit 1 x TAE-Puffer eingelassen. Daraufhin wurden die PCR-Produkte mit 3 µl 5x DNA Loading Buffer (Biozym) vermischt und in die Vertiefungen des Gels überführt. Zusätzlich wurde der Quantitas DNA Marker 50 bp- 2 kb (Biozym) zur Auftrennung in das Gel überführt, um die PCR-Produktgröße ermitteln zu können. Die Auftrennung des Gels erfolgte durch das PowerPacTM Basic (BioRad) bei 125 V für 40 Minuten. Die Dokumentation erfolgte im Anschluss am Transilluminator UVsolo (Biometra).

Wenn in der Gelelektrophorese bei den –RT-Kontrollen kein Signal detektiert werden konnte, wurde die nun überprüfte cDNA für die weiteren Untersuchungen genutzt.

Ansetzen der Lösung:

TAE-Puffer: 10 x Puffer: 145, 2 g Tris (Carl Roth)
 11, 1 g EDTA (Carl Roth)
 3 Liter Aqua bidest
 pH 8 eingestellt mit Essigsäure (Merck)

3.2.3.5 Quantitative realtime PCR

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde die quantitative realtime PCR (qRT-PCR) angewendet. Von besonderem Interesse war hierbei die Genexpression osteogener Differenzierungsmarker, um die osteogene Differenzierungskapazität der Zellen genauer zu beurteilen. Untersucht wurden die osteogenen Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase (ALP), Bone Sialoprotein (BSP), Osteocalcin (OC) und Runt-related transkription factor 2 (Runx2). Als Referenzgen (housekeeping gene) diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh). Des Weiteren wurde die Expression der Oberflächenantigene Cluster of differentiation 90 (CD90) und Cluster of differentiation 105 (CD105) in der qRT-PCR untersucht. Für die qRT-PCR wurde der QuantiTect Primer Assay (Qiagen) mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Die hier verwendeten Primer sind vom Hersteller designt und getestet. Im Folgenden sind die Katalognummern, die Referenzsequenzen (RefSeq) und die Produktgrößen der verwendeten Primer aufgelistet.

Tabelle 6: Primer qRT-PCR

Primer	RefSeq	Katalognummer	Produktgröße
Gapdh	NM_017008	QT00199633	149 bp
ALP	NM_013059	QT00190680	102 bp
BSP	NM_012587	QT02333296	61 bp
OC	NM_013414	QT01084573	113 bp
Runx2	NM_053470.2	QT01620647	84 bp
CD90	NM_012673	QT00195825	82 bp
CD105	NM_001010968	QT01689989	89 bp

Die qRT-PCR wurde laut Herstellerangaben am CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) durchgeführt. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Mastermixes:

Tabelle 7: Mastermix qRT-PCR

Reagenz	1 x Ansatz
QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µl
Primer (1 µM)	2,5 µl
RNase freies Wasser	8 µl

Zu 23 µl Mastermix wurden 2 µl cDNA gegeben, vermischt und in einer 96-well PCR-Platte (Bio-Rad) im CFX96 Cyclet nach folgendem Programm inkubiert:

1. 5 Minuten bei 95 °C
2. 10 Sekunden bei 95 °C
3. 30 Sekunden bei 60 °C

Wiederholung der Schritte 2 und 3 für 39 weitere Zyklen

4. Schmelzkurve: 60 °C bis 95 °C schrittweise Erhöhung der Temperatur um 0,5 °C für jeweils 5 Sekunden

Je Primer wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit der CFX Manager Software 2.0 (Bio-Rad) und mittels Berechnung der normalisierten Expression in Excel.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels dreifaktorieller, zweifaktorieller und einfaktorieller Varianzanalyse.

4 Ergebnisse

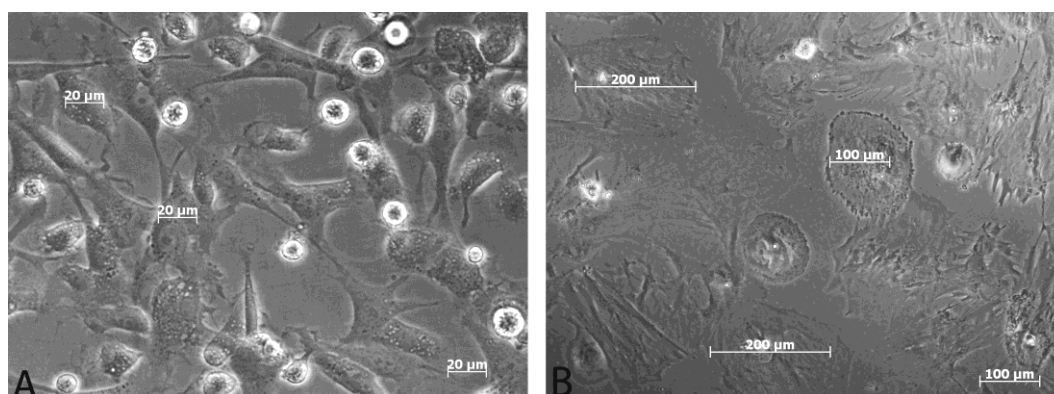
4.1 Morphologie der MSC

4.1.1 Morphologie der MSC der Ratten nach drei Monaten Standzeit

Die MSC von Ratten der Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid zeigten eine von der Kontroll-Gruppe (Sham) abweichende Morphologie. Während sich die Kulturen der Sham-Ratten vorwiegend aus schmalen, spindelförmigen Fibroblasten ähnlichen Zellen zusammensetzten, zeigten die Kulturen aus den beiden Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid vermehrt einen größeren, flacheren Zelltyp. Hierbei waren die Zellen zum Teil um das fünf-fache größer als die MSC der Sham-Gruppe. Am auffälligsten war das Auftreten des großen, flachen Zelltyps in der Gruppe OVX + Diät. Allerdings zeigten die Kulturen aller Gruppen ein heterogenes Bild, das heißt auch in den behandelten Gruppen OVX + Diät sowie OVX + Steroid waren Zellen vom spindelförmigen, Fibroblasten ähnlichen Typ zu finden, allerdings anteilig in einer geringeren Anzahl. Des Weiteren war die Morphologie der Zellen auch innerhalb einer Gruppe individuell unterschiedlich. Das heißt nicht alle Kulturen der behandelten Gruppen wiesen dieses von großen, flachen Zellen dominierte Bild auf. Dennoch waren die Unterschiede bezüglich der Morphologie zwischen den Gruppen alle Kulturen betrachtend deutlich.

Die Abbildung 2 zeigt exemplarisch Nativaufnahmen von MSC der Sham-Gruppe (A) und der Gruppe OVX + Diät (B). Die Zellen der Sham-Gruppe haben einen Durchmesser von 20 µm, während die Zellen der OVX + Diät Gruppe zum Teil Durchmesser von 100 µm und mehr aufweisen. Die MSC der Sham-Gruppe sind deutlich spindelförmig (A), die MSC der Gruppe OVX + Diät im Bild B zeigen eine eher polygonale Form.

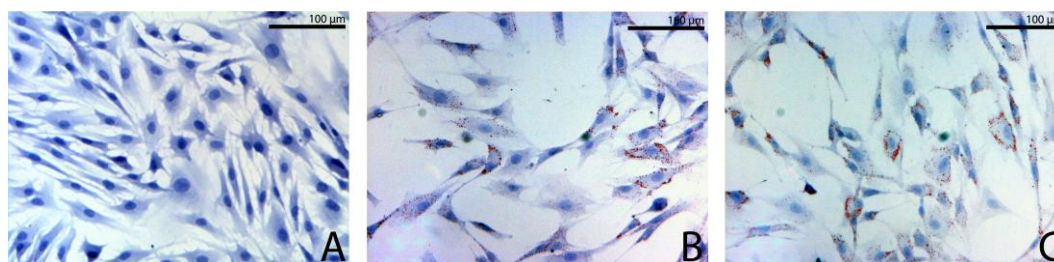
Abbildung 2: *Nativaufnahme: Morphologie der MSC (3 Monate Standzeit)*



MSC der Sham-Gruppe (A) im Vergleich zu MSC der Gruppe OVX + Diät (B)

Des Weiteren zeigten sich morphologische Unterschiede zwischen den Gruppen bei Betrachtung von Oil Red O gefärbten, undifferenzierten Zellen. In MSC der beiden behandelten Gruppen OVX + Diät sowie OVX + Steroid waren tendenziell mehr Fettvakuolen im Zytoplasma zu finden, ohne dass die Zellen zur adipogenen Differenzierung zuvor induziert worden waren. Die Abbildung 3 zeigt Aufnahmen der Oil Red O gefärbten Zellen jeder Gruppe. MSC einer Kontroll-Ratte zeigen hier keine rot angefärbten Fettvakuolen im Zytoplasma (A), wo hingegen MSC der Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid im Vergleich viele rot angefärbte Fettvakuolen aufweisen.

Abbildung 3: *Oil Red O Färbung undifferenzierter MSC (3 Monate Standzeit)*



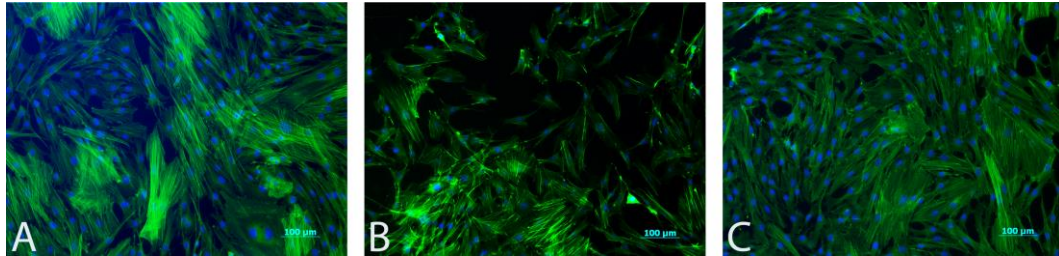
Oil Red O angefärbte MSC der Gruppen Sham (A), OVX + Diät (B) und OVX + Steroid (C).

Wobei auch hier angemerkt werden muss, dass es starke inter-individuelle Unterschiede auch innerhalb der Gruppen gab.

Um das Aktinzytoskelett der MSC darzustellen wurde bei den Zellen, die nach drei Monaten Standzeit isoliert wurden, die Phalloidininfärbung angewendet. Hierbei zeigten sich keine strukturellen Unterschiede zwischen den MSC der unterschiedlichen Gruppen. Die MSC der behandelten Gruppen OVX + Diät und OVX

+ Steroid zeigten ein ebenso gut ausgeprägtes Aktinzytoskelett ohne Veränderungen wie die MSC der Sham Gruppe. Die Abbildung 4 zeigt Aufnahmen der Phalloidininfärbung von MSC jeder Gruppe.

Abbildung 4: *Phalloidininfärbung (3 Monate Standzeit)*

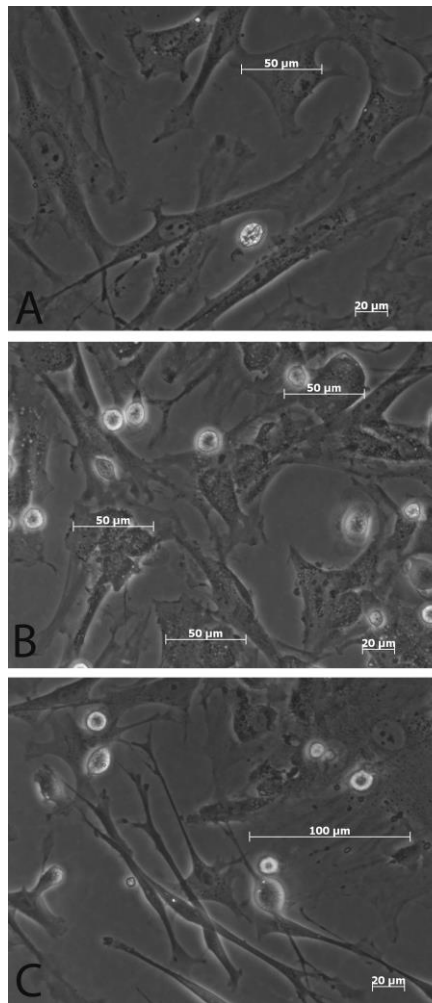


Phalloidininfärbung: Sham (A), OVX + Diät (B), OVX + Steroid (C)

4.1.2 Morphologie der MSC der Ratten nach 12 Monaten Standzeit

Bei den MSC, die nach zwölf Monaten Standzeit isoliert wurden, waren keine deutlichen Unterschiede in der Morphologie zu erkennen wie bei nach drei Monaten isolierten MSC. Die Kulturen aller drei Gruppen wiesen ein heterogenes Zellbild auf, das sich aus spindelförmigen und polygonalen Zellen zusammensetzte. Allerdings waren nun auch in Kulturen der Sham Gruppe etwas größere Zellen in höherem Anteil zu finden. Zusammengefasst, zeigten sich keine morphologischen Unterschiede zwischen MSC aus den behandelten Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid im Vergleich zu MSC aus der Kontroll-Gruppe (Sham). Abbildung 5 zeigt Nativaufnahmen von MSC aus allen drei Gruppen nach zwölf Monaten Standzeit.

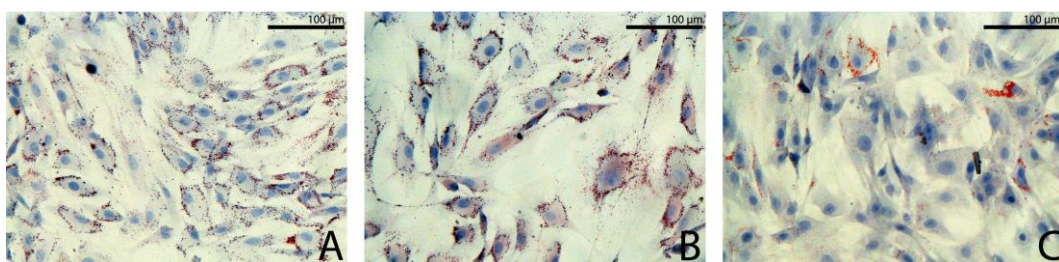
Abbildung 5: *Nativaufnahme: Morphologie der MSC (12 Monate Standzeit)*



MSC der Gruppen Sham (A), OVX + Diät (B) und OVX + Steroid (C) nach 12 Monaten Standzeit isoliert.

Die Oil Red O Färbung undifferenzierter Zellen betrachtend fiel auf, dass sich in allen drei Gruppen viele Fettvakuolen im Zytoplasma befanden. Dieses Phänomen trat in jeder einzelnen der insgesamt 15 Kulturen auf. Abbildung 6 zeigt die Oil Red O Färbung undifferenzierter MSC jeder Gruppe, Sham (A), OVX+ Diät (B) und OVX + Steroid (C).

Abbildung 6: *Oil Red O Färbung undifferenzierter MSC (12 Monate Standzeit)*

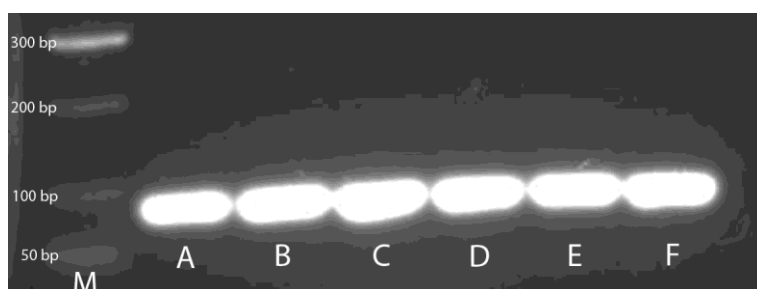


Oil Red O angefärbte MSC der Gruppen Sham (A), OVX + Diät (B) und OVX + Steroid (C).

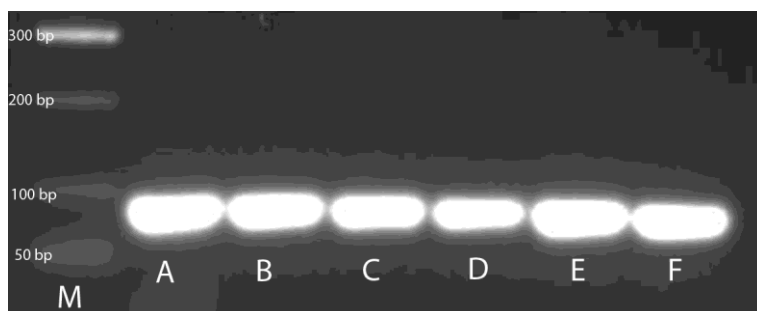
4.2 Expression der Oberflächenmarker CD90 und CD105

In der qRT-PCR wurden Genexpressionsanalysen der stammzell-spezifischen Oberflächenmarker CD90 und CD105 durchgeführt. Es konnte hiermit gezeigt werden, dass alle isolierten MSC, gleich aus welcher Gruppe, die Oberflächenmarker CD90 und CD105 exprimierten. Die folgende Abbildung 7 zeigt die Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte für CD90 und CD105 aller Gruppen.

Abbildung 7: Gelelektrophorese: CD90 und CD105



CD 90: Produktgröße 82 bp



CD105: Produktgröße 89 bp

(A) Sham, Standzeit 3 Monate; (B) Sham, Standzeit 12 Monate; (C) OVX + Diät, Standzeit 3 Monate; (D) OVX + Diät, Standzeit 12 Monate; (E) OVX + Steroid, Standzeit 3 Monate; (F) OVX + Steroid, Standzeit 12 Monate; (M) Marker

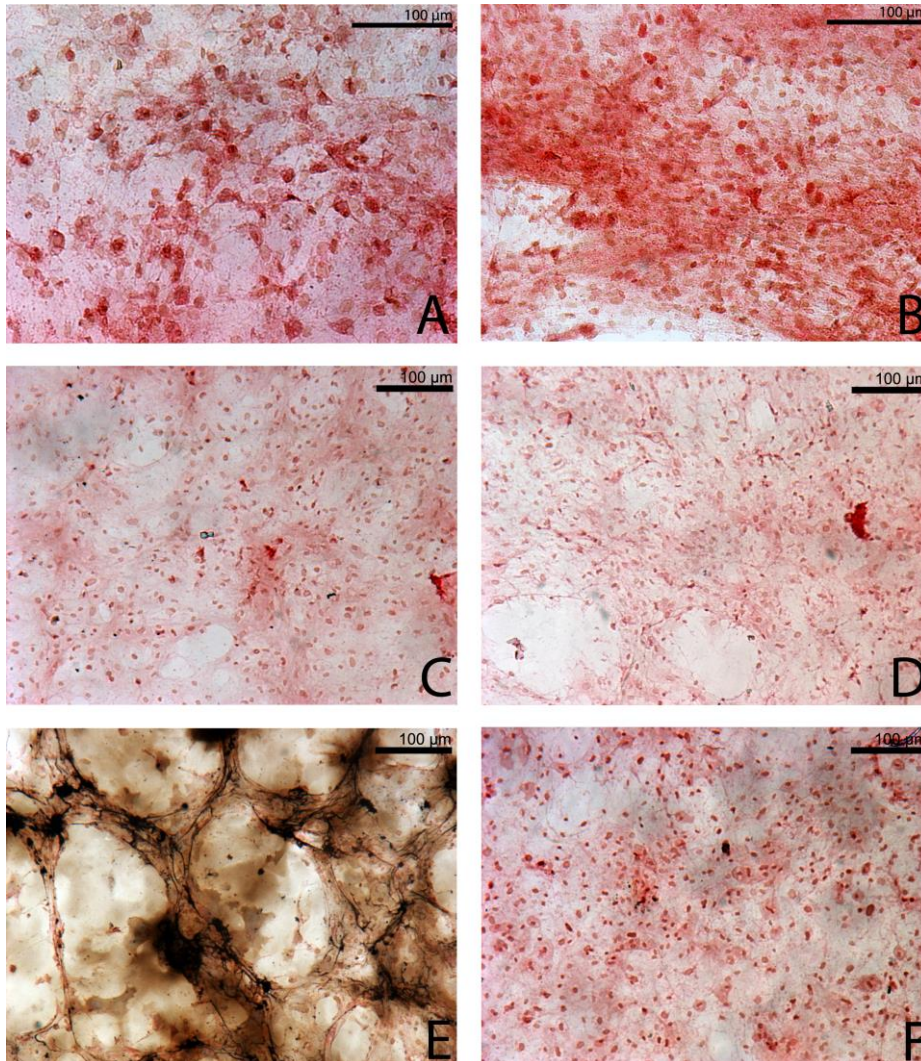
4.3 Osteogene Differenzierung

4.3.1 Ergebnisse der Vorversuche zur osteogenen Differenzierung: Ermittlung der geeigneten Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums

In den Vorversuchen zur osteogenen Differenzierung wurden zunächst an MSC von Kontroll-Ratten verschiedene Zusammensetzungen des Differenzierungsmediums, wie in Tabelle 1 aufgeführt, getestet. Die Überprüfung der Differenzierung erfolgte mittels Beurteilung der von Kossa Färbung. Nach 14-tägiger Inkubation der MSC mit den Differenzierungsmedien Nummer 1, 2 und 3 zeigte die von Kossa Färbung keine schwarz angefärbten Areale. Es konnten keine Unterschiede zu den Negativkontrollen mit Basismedium festgestellt werden. Dies lies darauf schließen, dass die Zellen keine Calcium-haltige extrazelluläre Matrix gebildet hatten und somit durch diese Zusammensetzungen des Differenzierungsmediums nicht zur osteogenen Differenzierung induziert werden konnten. Nach Inkubation mit dem Differenzierungsmedium Nummer 4 konnte im Gegensatz dazu dann eine deutliche schwarze Anfärbung extrazellulärer Matrix festgestellt werden. Die MSC zeigten mit dieser Zusammensetzung des Mediums eine Differenzierung in die osteogene Linie. Daraufhin wurde für die folgenden Untersuchungen die Zusammensetzung des Differenzierungsmediums Nummer 4 gewählt.

Abbildung 8 zeigt exemplarisch von Kossa gefärbte Kulturen mit den Differenzierungsmedien Nummer 1 (A), 2 (C) und 4 (E) inklusive der jeweilig durchgeführten Negativkontrollen (B, D, F).

Abbildung 8: Vorversuche zur osteogenen Differenzierung: Ermittlung der geeigneten Zusammensetzung des Differenzierungsmediums



Von Kossa Färbung nach 14-tägiger Inkubation mit unterschiedlichen Zusammensetzungen des Differenzierungsmediums.

- | | |
|--------------------------------------|----------------------|
| (A) Differenzierungsmedium Nummer 1, | (B) Negativkontrolle |
| (C) Differenzierungsmedium Nummer 2, | (D) Negativkontrolle |
| (E) Differenzierungsmedium Nummer 4, | (F) Negativkontrolle |

4.3.2 Osteogene Differenzierung: MSC der Ratten nach drei Monaten Standzeit

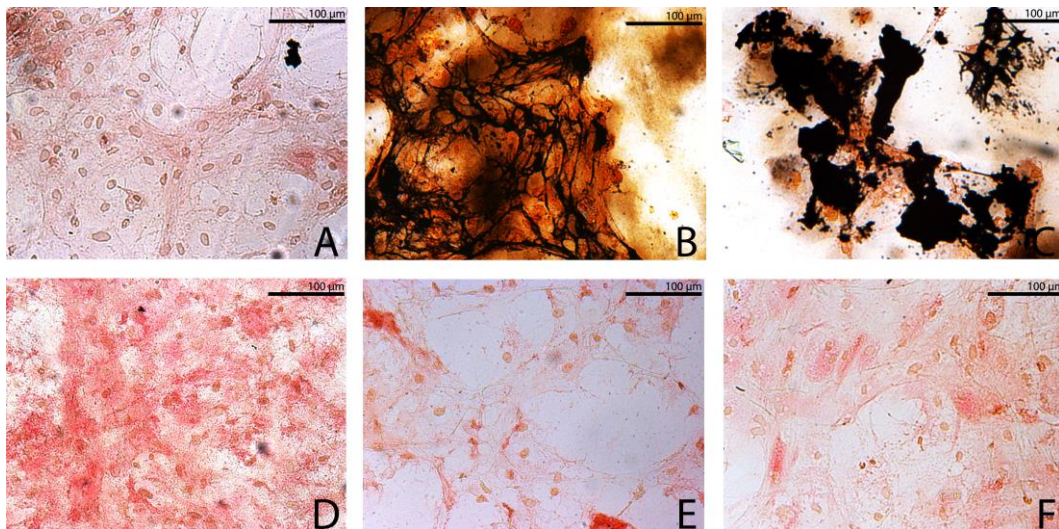
Die osteogene Differenzierungskapazität der MSC wurde anhand dreier unterschiedlicher Methoden beurteilt. Morphologisch erfolgte die Bewertung mittels von Kossa Färbung. Des Weiteren wurde die Menge an Gesamt-Calcium in den Kulturen bestimmt, und somit die Menge an extrazellulär gebildetem Calcium. Darüber hinaus wurden in der qRT-PCR die Genexpression der osteogenen Diffe-

renzierungsmarker ALP, BSP, OC und RUNX2 ermittelt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der jeweiligen Analysen für MSC, die nach drei Monaten Standzeit isoliert wurden, aufgeführt.

4.3.2.1 Von Kossa Färbung

In der Von Kossa Färbung zeigten sich bei allen MSC jeder Gruppe Anzeichen der osteogenen Differenzierung. Die MSC lagerten sich zu „bone nodules“ zusammen und es wurde, durch die Von Kossa Färbung schwarz angefärbte, Calcium-haltige Matrix gebildet. Allerdings zeigten sich tendenzielle Unterschiede in der osteogenen Differenzierungskapazität zwischen den Gruppen. So zeigten MSC aus Ratten der Sham Gruppe eher weniger schwarz angefärbte Extrazellulärmatrix im Gegensatz zu MSC aus den behandelten Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid. In Kulturen der behandelten Gruppen zeigte sich tendenziell eine stärker ausgeprägte Schwarzfärbung und auch eine deutlicher Bildung der „bone nodules“. Auch hier waren jedoch auch inter-individuelle Unterschiede zu bemerken, insofern, dass nicht immer alle MSC der Gruppen diesem Schema entsprachen. Genauer gesagt, zeigten in der Sham Gruppe drei der fünf untersuchten Ratten eine eher gering ausgeprägte osteogene Differenzierung in der von Kossa Färbung. In der Gruppe OVX + Diät zeigten drei Tiere eine sehr ausgeprägte Differenzierung, in der Gruppe OVX + Steroid wiesen vier der fünf untersuchten Individuen eine stark ausgeprägte schwarze Anfärbung in den Kulturen auf. In den zusätzlich durchgeführten Negativkontrollen NC1 und NC2 konnten keine Anzeichen einer osteogenen Differenzierung festgestellt werden. Die nachfolgende Abbildung 9 zeigt exemplarisch die Von Kossa Färbung osteogen differenzierter MSC aus jeder Gruppe, Sham (A), OVX + Diät (B) und OVX + Steroid (C). Zu jeder Gruppe ist zusätzlich die Negativkontrolle (NC2) (D, E, F) dargestellt.

Abbildung 9: Von Kossa Färbung (3 Monate Standzeit)



Von Kossa Färbung nach 14-tägiger osteogener Stimulation, Vergrößerung 10x, (A) Sham, osteogen differenziert, (D) Sham, Negativkontrolle NC2, (B) OVX + Diät, osteogen differenziert, (E) OVX + Diät, Negativkontrolle NC2, (C) OVX + Steroid, osteogen differenziert, (F) OVX + Steroid, Negativkontrolle NC2

Die beiden Abbildungen (B) und (C) zeigen die deutlichen Anzeichen der osteogenen Differenzierung der Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid. Es zeigt sich hier eine stark ausgeprägte Schwarzfärbung der Extrazellulärmatrix sowie die deutliche Formierung der Zellen zu „bone nodules“. Im Vergleich dazu zeigt das Bild (A) von MSC der Sham Gruppe eine schwache schwarze Anfärbung in nur einem kleinen Bereich.

4.3.2.2 Messung des Calcium-Gehaltes

In der Calcium-Messung zeigte sich korrespondierend zur Von Kossa Färbung durchschnittlich ein höherer Gehalt an Calcium in osteogen differenzierten Kulturen der behandelten Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid im Vergleich zur Kontroll-Gruppe Sham. Wie bereits beschrieben wurden für jede Probe Doppelmessungen durchgeführt und von diesen der Mittelwert errechnet. Des Weiteren wurden die Messungen der Negativkontrolle 1 (NC1 = Basismedium mit 2,2 mmol Calcium) von den Werten osteogen differenzierter Kulturen abgezogen, um einen möglichen Fehler durch das dem Medium zugesetzte Calcium auszuschließen.

Die endgültigen Werte ergeben sich aus den Mittelwerten der je fünf Kulturen pro Gruppe. In den beiden Negativkontrollen NC1 und NC2 wurden sehr niedrige Calcium-Werte nahe Null gemessen.

Die Gruppe OVX + Diät zeigt den höchsten Calcium-Wert von 1,331 mmol Calcium/l, gefolgt von der Gruppe OVX + Steroid mit 1,148 mmol Calcium/l. Die Sham Gruppe erreicht einen Mittelwert von 0,611 mmol Calcium/l.

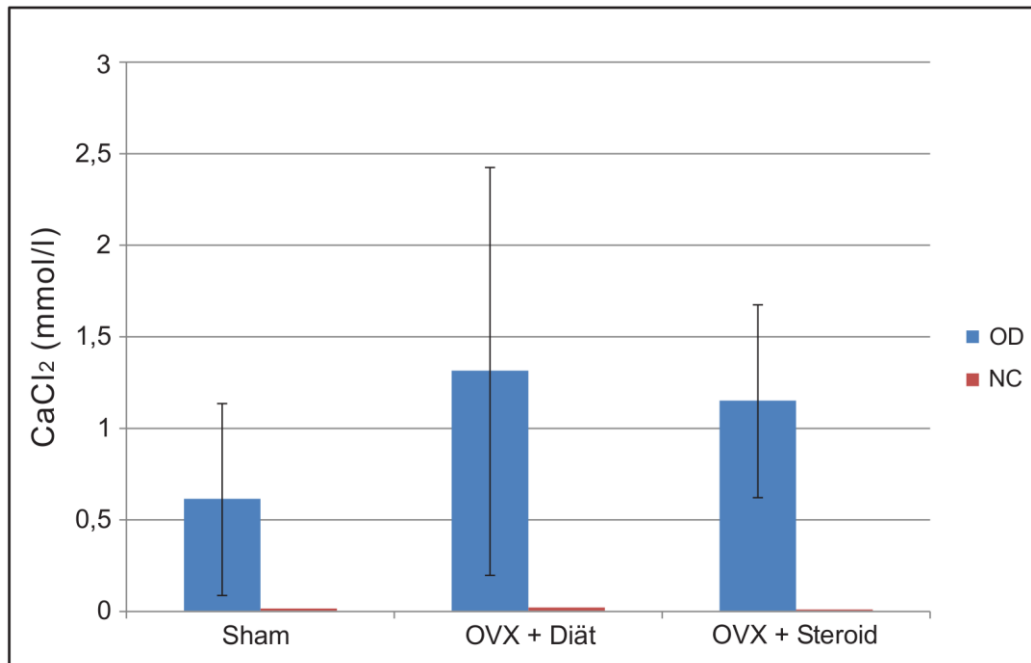
Die nachfolgende Tabelle 8 zeigt die errechneten Mittelwerte jeder Gruppe für osteogen differenzierte Kulturen (OD) und die Negativkontrollen NC1 und NC2 sowie die korrigierten Werte durch Subtraktion von NC1.

Tabelle 8: *Calcium Messwerte (Standzeit 3 Monate)*

Gruppe	OD (MW n = 5)	NC1 (MW n = 5)	NC2 (MW n = 5)	OD – NC1
Sham	0,73375 mmol/l	0,1225 mmol/l	0,0125 mmol/l	0,611 mmol/l
OVX + Diät	1,424 mmol/l	0,113 mmol/l	0,018 mmol/l	1,331 mmol/l
OVX + Steroid	1,251 mmol/l	0,103 mmol/l	0,007 mmol/l	1,148 mmol/l

Die nachfolgende Abbildung 10 zeigt die Calcium-Messwerte für die MSC Standzeit drei Monate in graphischer Darstellung. Deutlich zeigen sich auch hier, bei Betrachtung der eingezeichneten Standardabweichung, die starken inter-individuellen Unterschiede innerhalb der Gruppen.

Abbildung 10: Calcium Messung nach osteogener Differenzierung (Standzeit 3 Monate)



OD = Osteogen differenziert, NC = Negativkontrolle (Zellen in Basismedium inkubiert)

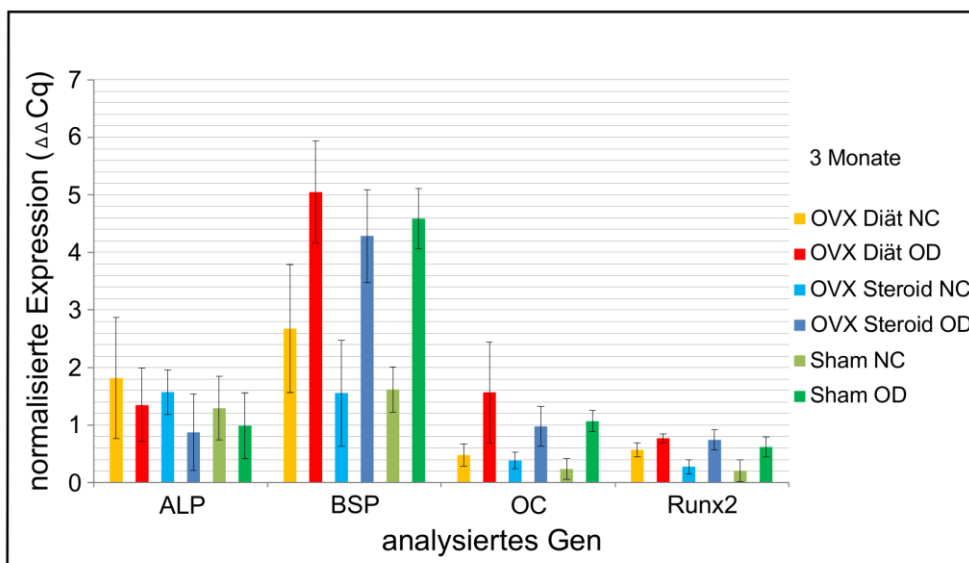
4.3.2.3 Molekularbiologische Ergebnisse: Expression osteogener Differenzierungsmarker

Mittels qRT-PCR wurde die Expression der osteogenen Differenzierungsmarker ALP, BSP, OC und RUNX2 analysiert. Die qRT-PCR wurde mittels Schmelzkurvenanalyse in der CFX Manager Software 2.0 (Bio-Rad) und anhand der jeweiligen Produktgrößen in der Agarosegelelektrophorese (siehe Anhang, Abbildung 23) überprüft. Die endgültigen Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von je fünf untersuchten Individuen pro Gruppe (n = 5 / Gruppe). Die mRNA-Expression der Marker BSP, OC und RUNX2 wurde in Zellen, die mit osteogenem Medium inkubiert wurden, im Vergleich zu den Negativkontrollen deutlich hoch reguliert. Die höchste mRNA-Expression von BSP und OC zeigen sich in der Gruppe OVX + Diät, gefolgt von der Kontroll-Gruppe Sham. Die niedrigsten Expressionen dieser beiden Marker zeigen sich bei der Gruppe OVX + Steroid. Die mRNA-Expression von RUNX2 war ebenso in osteogen differenzierten Zellen der Gruppe OVX + Diät am höchsten, gefolgt von der Gruppe OVX + Steroid und Sham.

Die mRNA-Expression der ALP ist in den Zellen, die mit Basismedium inkubiert wurden (NC2) höher exprimiert. Die höchste Expression zeigt sich hierbei in der Negativkontrolle der Gruppe OVX + Diät.

Die Abbildung 11 zeigt die Expression ($\Delta\Delta Cq$) der osteogenen Differenzierungsmarker ALP, BSP, OC und RUNX2 für die unterschiedlichen Gruppen inklusive der dazugehörigen Negativkontrollen.

Abbildung 11: Expression osteogener Differenzierungsmarker (Standzeit 3 Monate)



OD = Osteogen Differenziert, NC = Negativkontrolle (Zellen in Basismedium inkubiert)

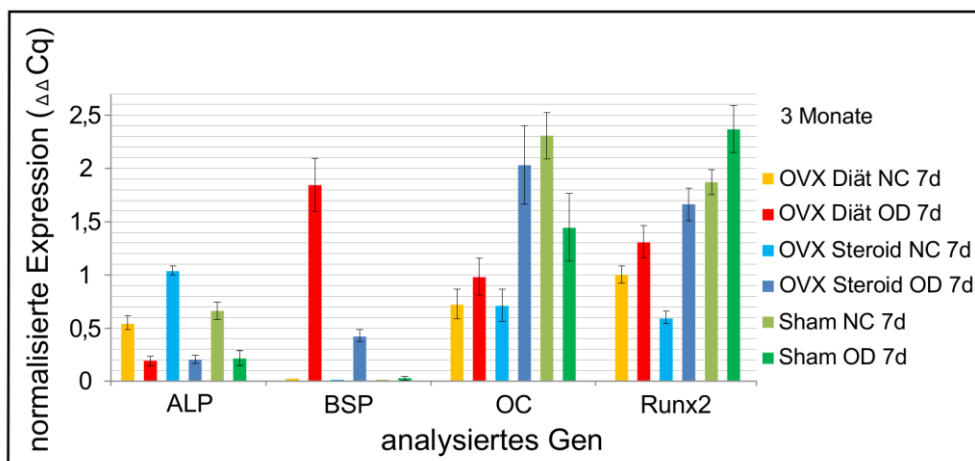
Um die Expression der ALP, als ein eher früh exprimierter Differenzierungsmarker, erneut zu überprüfen, wurde exemplarisch an Zellen je eines Tieres pro Gruppe die osteogene Differenzierung bereits nach einer Woche abgebrochen und die RNA aus diesen Proben isoliert. Mit diesen Proben wurde daraufhin in der qRT-PCR erneute die Expression der osteogenen Differenzierungsmarker bestimmt.

Die Abbildung 12 zeigt die Expression der osteogenen Differenzierungsmarker nach einer Woche osteogener Stimulation.

Auch bei Bestimmung der Expression nach sieben Tagen osteogener Stimulation ist die ALP in den Negativkontrollen (NC) höher exprimiert als in den osteogen differenzierten Kulturen. Die osteogenen Differenzierungsmarker BSP, OC und

RUNX2 sind dagegen auch hier in den osteogen differenzierten Zellen höher exprimiert. Einzige Ausnahme bilden hier jedoch Zellen der Gruppe Sham, die im Falle des Markers OC auch in den Negativkontrollen höher exprimiert ist. Es sollte hierbei berücksichtigt werden, dass es sich lediglich um eine exemplarische Untersuchung mit Zellen je eines Tieres pro Gruppe handelt.

Abbildung 12: Expression osteogener Differenzierungsmarker nach 7-tägiger osteogener Stimulation (3 Monate Standzeit)



OD = Osteogen Differenziert, NC = Negativkontrolle (Zellen in Basismedium inkubiert)

4.3.3 Osteogene Differenzierung: MSC der Ratten nach 12 Monaten Standzeit

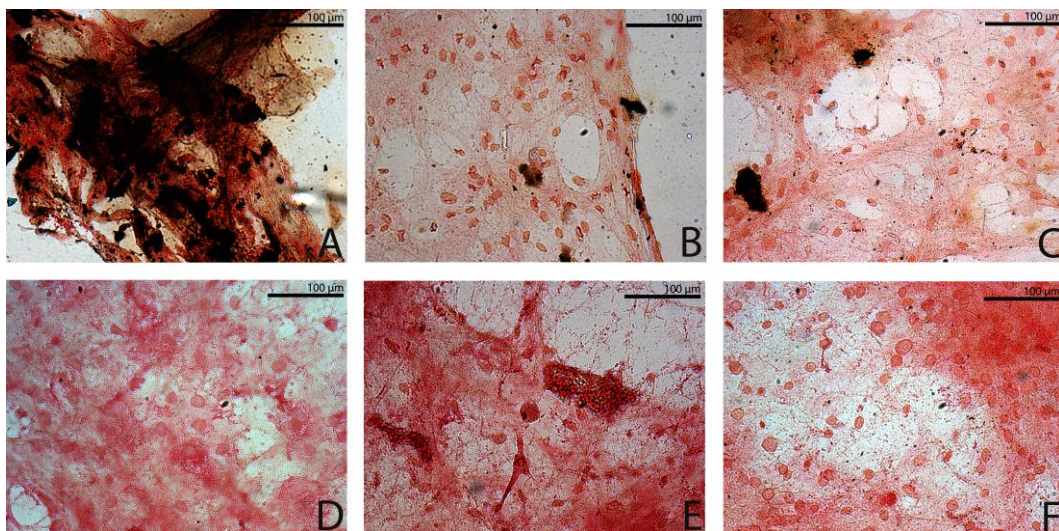
Die osteogene Differenzierungskapazität der MSC nach 12 Monaten Standzeit wurde ebenso anhand der Von Kossa Färbung, der Calcium-Messung und anhand der Expression der osteogenen Differenzierungsmarker beurteilt.

4.3.3.1 Von Kossa Färbung

Anhand der von Kossa Färbung konnte gezeigt werden, dass die MSC aller drei Gruppen zur osteogenen Differenzierung stimuliert werden konnten. In allen Kulturen konnten schwarz angefärbte Bereiche der Calcium-haltigen Extrazellulärmatrix detektiert werden. In den Negativkontrollen NC1 und NC2 hingegen wurde keine schwarze Anfärbung festgestellt.

Auch hier, bei MSC die nach 12 Monaten Standzeit isoliert wurden, zeigten sich Unterschiede in der Intensität der Von Kossa Färbung. Nach 12 Monaten Standzeit zeigten sich nun in Kulturen der Sham Gruppe deutlichere Anzeichen einer osteogenen Differenzierung, hier fanden sich in vier der fünf untersuchten Kulturen eine deutliche Bildung von „bone nodules“ und eine deutliche Schwarzfärbung. In der Mehrzahl der Kulturen der beiden behandelten Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid waren diese Anzeichen geringer ausgeprägt. In der Gruppe OVX + Diät zeigten vier der sechs untersuchten Zellkulturen eine schwache osteogene Differenzierung, in der Gruppe OVX + Steroid drei der vier untersuchten Kulturen. Die nachfolgende Abbildung 13 zeigt exemplarisch die Von Kossa Färbung von Zellen je eines Tieres pro Gruppe inklusive der jeweiligen Negativkontrolle.

Abbildung 13: Von Kossa Färbung (12 Monate Standzeit)



Von Kossa Färbung nach 14-tägiger osteogener Stimulation, Vergrößerung 10x
 (A) Sham, osteogen differenziert, (D) Sham, Negativkontrolle NC2, (B) OVX + Diät, osteogen differenziert, (E) OVX + Diät, Negativkontrolle NC2, (C) OVX + Steroid, osteogen differenziert, (F) OVX + Steroid, Negativkontrolle NC2

4.3.3.2 Messung des Calcium-Gehaltes

In der Messung des Calcium-Gehaltes zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Gruppe Sham zeigt den höchsten Calcium-Messwert von 1,221 mmol / l. Die nachfolgende Tabelle 9 zeigt die Calcium-Messwerte für die Standzeit 12 Monate. Die Berechnung erfolgte wie bei den Zellen der Standzeit drei Monate.

Tabelle 9: Calcium Messwerte (Standzeit 12 Monate)

Gruppe	OD	NC1	NC2	OD – NC1
Sham (MW n = 5)	1,306 mmol/l	0,085 mmol/l	0,04 mmol/l	1,221 mmol/l
OVX + Diät (MW n = 6)	1,117 mmol/l	0,069 mmol/l	0,04 mmol/l	1,0475 mmol/l
OVX + Steroid (MW n = 4)	1,03875 mmol/l	0,03 mmol/l	0,01 mmol/l	1,0087 mmol/l

Um die Methode nochmals zu überprüfen wurde in einer exemplarischen Messung an drei unterschiedlichen Kulturen überprüft, ob die Calcium-Werte im Medium konstant sind. Verglichen wurden die Calcium-Werte im Medium-Überstand mit den Werten aus den lysierten Zellverbänden. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die gemessenen Calcium-Werte von den Zellen gebildeter Calcium-haltiger extrazellulärer Matrix stammten und nicht als Ausfall durch den Zusatz von Calcium zum Medium. Die nachfolgende Tabelle zeigt die gemessenen Calcium-Mengen im Zell-Lysat und in den unterschiedlichen Medien für Zellen eines Tieres der Kontroll-Gruppe (Sham) und zwei Tieren der Gruppe OVX + Diät.

Tabelle 10: Calcium Messung Medium-Überstand und Zell-Lysat

Zellkultur	Zellbehandlung	CaCl ₂ (mmol/l) Zell-Lysat	CaCl ₂ (mmol/l) Medium- Überstand	CaCl ₂ (mmol/l) Sollwert Medium
Ra 59_11 (Sham)	OD	0,56	3,74	4
	NC1	0,125	3,78	4
	NC2	0,105	1,85	1,8
Ra 44_11 (OVX + Diät)	OD	0,605	3,77	4
	NC1	0,235	3,65	4
	NC2	0,09	1,84	1,8
Ra 45_11 (OVX + Diät)	OD	0,51	3,71	4
	NC1	0,13	3,84	4
	NC2	0,08	1,86	1,8

Die leicht von 4 mmol/l abweichenden Werte im Medium-Überstand des Differenzierungsmediums und des Basismediums mit Zusatz von Calcium (NC1) sind möglicherweise als Fehler beim Abwiegen des Calciums auf der Feinwaage beziehungsweise als Messfehler zu betrachten. Das Basismedium für die Differenzierungen DMEM hat selbst einen Calcium-Gehalt von 1,8 mmol/l. Durch die Zugabe von FBS, welches ebenso Calcium enthält, wird dieser Wert etwas angehoben.

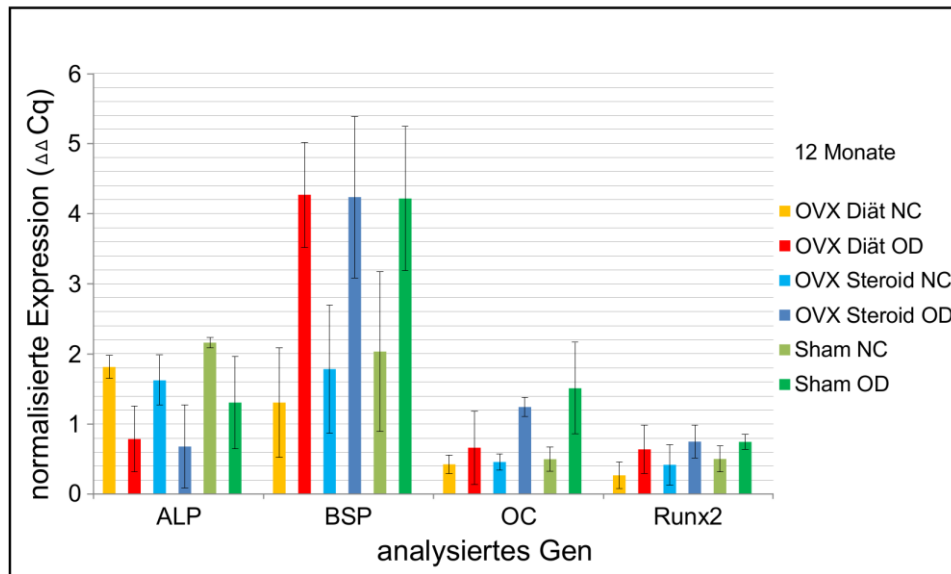
4.3.3.3 Molekularbiologische Ergebnisse: Expression osteogener Differenzierungsmarker

Die Überprüfung und Auswertung der qRT-PCR erfolgte wie bereits bei Zellen der Standzeit drei Monate beschrieben (PCR-Produkte in der Gelelektrophorese siehe Anhang, Abbildung 23).

Durch die Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium wurde die Expression der osteogenen Differenzierungsmarker BSP, OC und RUNX2 im Vergleich zu den Negativkontrollen (NC2) deutlich hochreguliert. Lediglich im Falle der ALP zeigte sich, wie bereits bei der Standzeit drei Monate beobachtet, eine höhere Expression in den Negativkontrollen. Die Expression der Marker OC und RUNX2 war bei der Gruppe Sham am höchsten, gefolgt von der Gruppe OVX + Steroid. Die Gruppe OVX + Diät zeigte bei diesen beiden Markern die niedrigste Expression. Der osteogene Differenzierungsmarker BSP war in der Gruppe OVX + Diät am höchsten exprimiert, gefolgt von der Sham Gruppe und OVX + Steroid.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Expression der Differenzierungsmarker in graphischer Darstellung.

Abbildung 14: Expression osteogener Differenzierungsmarker (Standzeit 12 Monate)

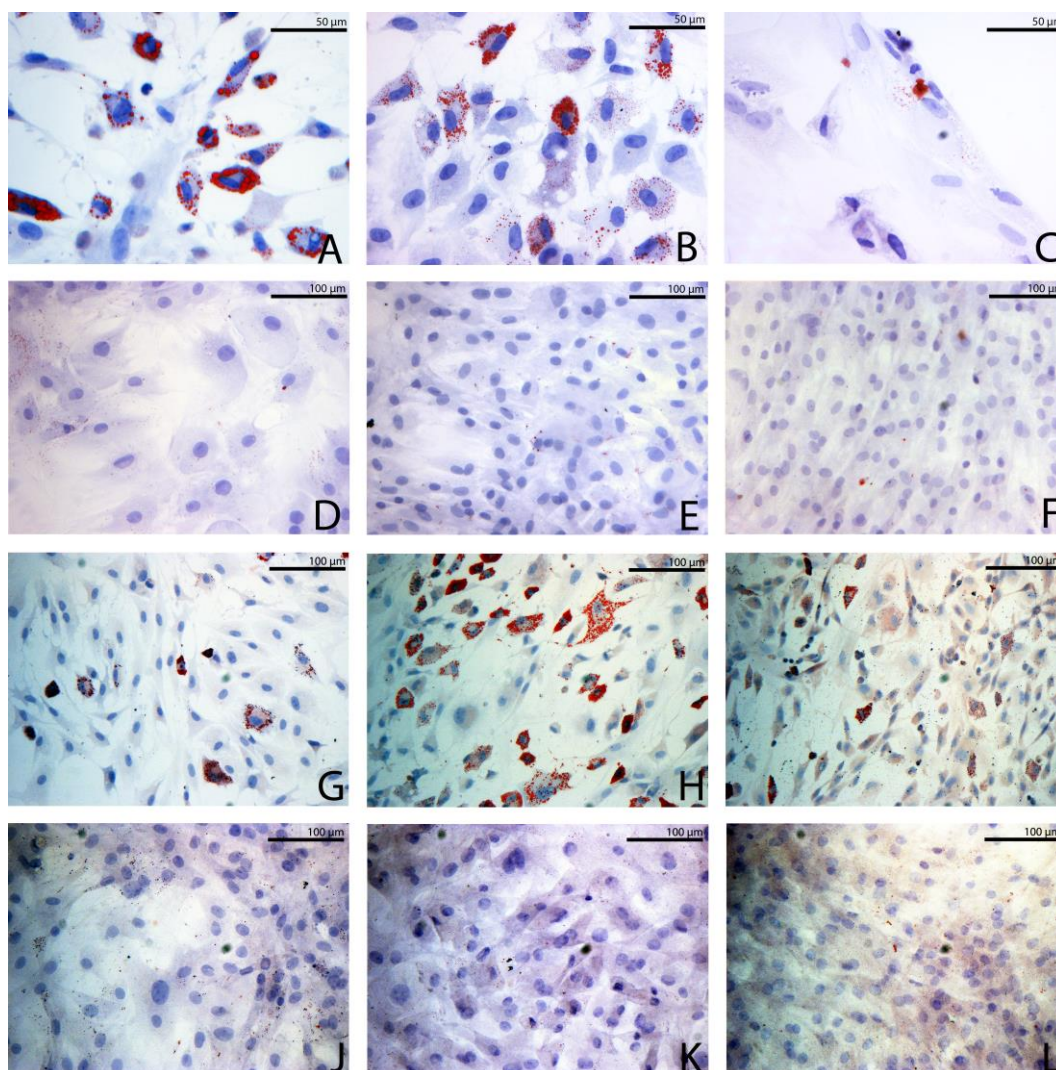


OD = Osteogen differenziert, NC = Negativkontrolle (Zellen in Basismedium inkubiert)

4.4 Die Adipogene Differenzierung

Durch die Inkubation mit adipogenem Differenzierungsmedium konnten MSC aller Gruppen und Standzeiten zur adipogenen Differenzierung induziert werden.

Abbildung 15: Adipogene Differenzierung: Oil Red O Färbung (Standzeit 3 und 12 Monate)



(A) Sham Standzeit 3 Monate, adipogen differenziert; (D) Negativkontrolle; (B) OVX + Diät Standzeit 3 Monate, adipogen differenziert; (E) Negativkontrolle; (C) OVX + Steroid Standzeit 3 Monate, adipogen differenziert; (F) Negativkontrolle; (G) Sham Standzeit 12 Monate, adipogen differenziert; (J) Negativkontrolle; (H) OVX + Diät Standzeit 12 Monate, adipogen differenziert; (K) Negativkontrolle; (I) OVX + Steroid Standzeit 12 Monate, adipogen differenziert; (L) Negativkontrolle

Beurteilt wurde die adipogene Differenzierungskapazität anhand der Oil Red O Färbung. In allen Kulturen, die mit adipogenem Differenzierungsmedium inkubiert wurden, zeigten sich vermehrt Fettvakuolen im Zytoplasma. In den Negativkontrollen hingegen konnte keine vermehrte Fettvakuolen-Bildung festgestellt

werden. Die Abbildung 15 zeigt die Oil Red O Färbung nach adipogener Differenzierung und die jeweiligen Negativkontrollen für die Gruppen Sham, OVX + Diät und OVX + Steroid zu den Standzeiten 3 und 12 Monaten.

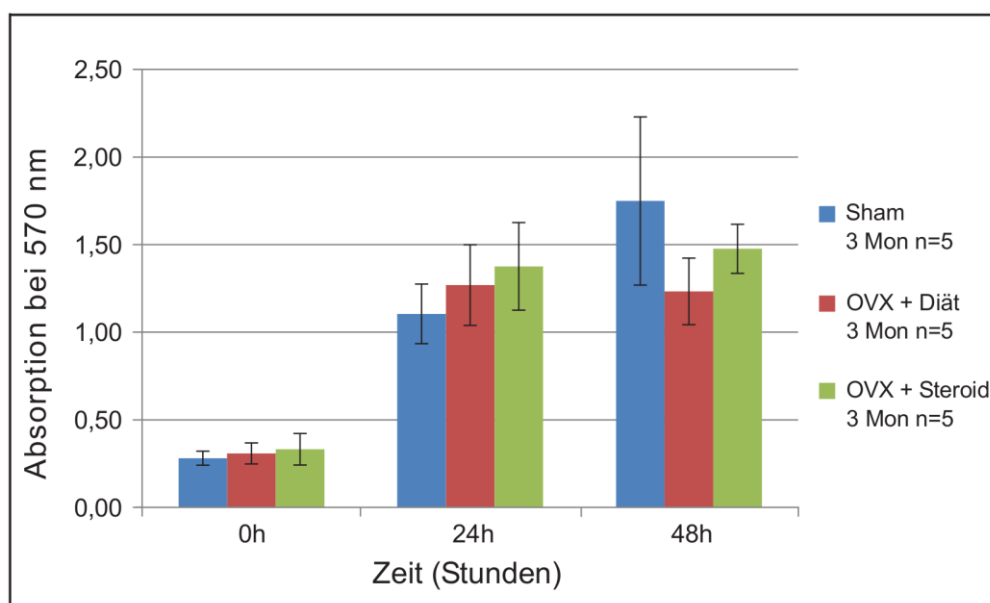
4.5 Die Proliferationskapazität der Zellen: Ergebnisse des MTT Test

Zur Beurteilung der Proliferationskapazität der MSC wurde der MTT Test angewendet. Die Reduktion des gelben Farbstoffs MTT zu violetten Formazan-Kristallen erfolgt nur in vitalen Zellen, durch die Messung der Absorption kann die Anzahl vitaler Zellen verglichen werden.

4.5.1 Ergebnisse des MTT Test: Standzeit 3 Monate

Die gemessene Absorption zu den Zeitpunkten null Stunden und 24 Stunden war zwischen den Gruppen annähernd gleich, nach 48 Stunden allerdings zeigte sich bei der Sham Gruppe eine höhere Absorption im Vergleich zu den behandelten Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid. Bei der Gruppe OVX + Diät wurden hierbei die niedrigsten Absorptionswerte gemessen. Die folgende Abbildung zeigt eine graphische Darstellung der gemessenen Absorptionen der drei Gruppen.

Abbildung 16: MTT Test (Standzeit 3 Monate)



Zudem wurde der Proliferationsfaktor als Quotient aus der Absorption nach 48 Stunden und der Absorption nach Null Stunden errechnet. Die nachfolgende Tabelle zeigt die errechneten Proliferationsfaktoren für alle MSC der Ratten der Gruppen Sham, OVX + Diät und OVX + Steroid.

Tabelle 11: Proliferationsfaktor (Standzeit 3 Monate)

Gruppe	Proliferationsfaktor $y(48h)/y(0h)$
Sham, Standzeit 3 Monate (n=5)	6,2083
OVX + Diät, Standzeit 3 Monate (n=5)	4,3178
OVX + Steroid, Standzeit 3 Monate (n=5)	4,9508

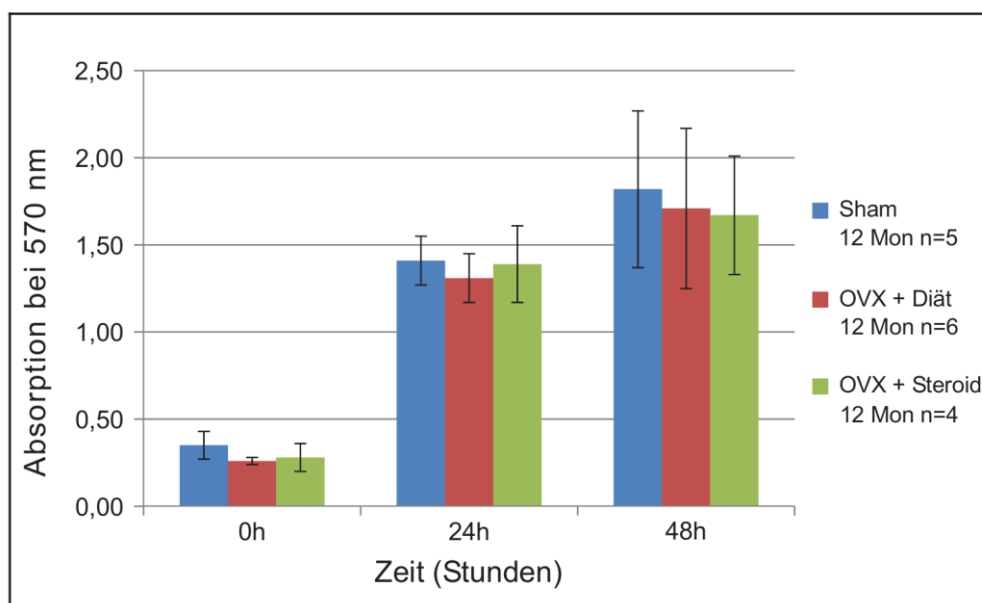
Bei Betrachtung des Proliferationsfaktors zeigen MSC der beiden behandelten Gruppen einen niedrigeren Wert als MSC der Kontroll-Gruppe (Sham). Durch die Berechnung des Proliferationsfaktors können Fehler durch Schwankungen in der Anfangszellzahl ausgeglichen werden.

Aus diesen Werten lässt sich auf die Proliferationskapazität der MSC rückschließen. Die MSC der Kontroll-Gruppe Sham zeigten im Vergleich zu den behandelten Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid eine höhere Proliferationskapazität. Die Zellen der Gruppe OVX + Diät wiesen die schlechteste Proliferationskapazität auf.

4.5.2 Ergebnisse des MTT Test: Standzeit 12 Monate

Die Absorptionswerte im MTT Test der MSC nach der Standzeit 12 Monate zeigten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen. Alle drei Gruppen wiesen Absorptionswerte und somit eine Proliferationskapazität vergleichbar mit der Gruppe Sham der Standzeit 3 Monate auf. Die Abbildung 17 zeigt die Absorptionswerte aller drei Gruppen.

Abbildung 17: MTT Test (Standzeit 12 Monate)



Auch bei MSC der Standzeit 12 Monate wurde zusätzlich der Proliferationsfaktor berechnet. Tabelle 12 zeigt die errechneten Proliferationsfaktoren. Es sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den Werten der Gruppen zu erkennen.

Tabelle 12: Proliferationsfaktor (Standzeit 12 Monate)

Gruppe	Proliferationsfaktor $y(48h)/y(0h)$
Sham, Standzeit 12 Monate (n=5)	5,6158
OVX + Diät, Standzeit 12 Monate (n=6)	6,4498
OVX + Steroid, Standzeit 12 Monate (n=4)	6,2530

4.6 Die Migrationskapazität

Zur Beurteilung der Migrationskapazität der MSC wurden die Nativaufnahmen des Life-Cell Imaging mittels Adobe Photoshop software cs5 ausgewertet. Berechnet wurde hierbei die anteilige zell-unbedeckte Fläche an der Gesamtfläche der Aufnahme über die Zeit sowie das Maß für die Geschwindigkeit der Migration b .

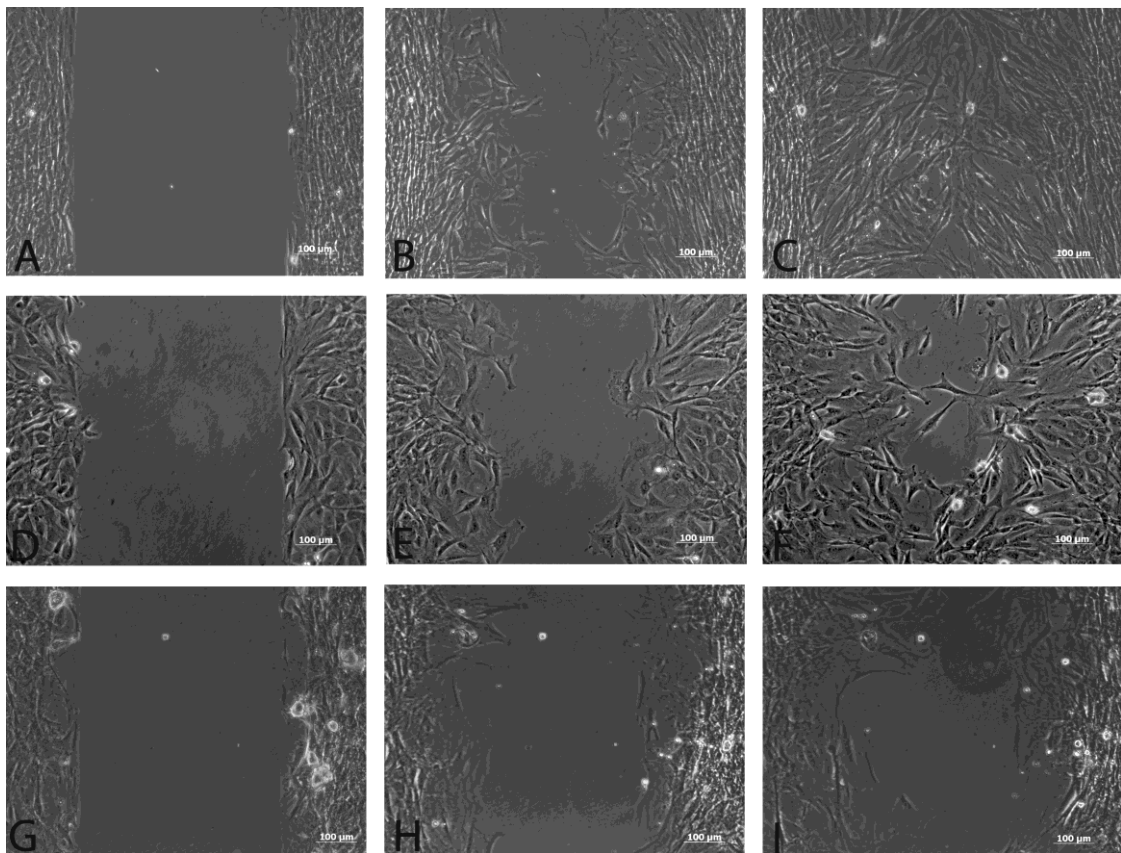
4.6.1 Migrationskapazität: Standzeit 3 Monate

Die Analyse der Aufnahmen des Life-Cell Imaging zeigte, dass die MSC der behandelten Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid im Vergleich zur Kontrollgruppe Sham einen längeren Zeitraum benötigen um die zell-unbedeckte Fläche zu überwandern. Hierbei zeigte die Gruppe OVX + Diät die schlechteste Migrationskapazität. Die Zellen eines Tieres dieser Gruppe schloss die unbedeckte Fläche nicht innerhalb von 48 Stunden.

Die folgende Abbildung 18 zeigt Nativaufnahmen der MSC je einer Ratte pro Gruppe zu den Zeitpunkten null Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden.

In dieser Abbildung ist deutlich zu sehen, dass die MSC der Gruppen OVX + Diät (G – I) und OVX + Steroid (D – F) nach 24 Stunden die zell-unbedeckte Fläche im Gegensatz zur Sham Gruppe (A – C) noch nicht geschlossen haben. In den Bildern der Gruppe OVX + Diät (G – I) ist zudem vermehrt der flache, großflächige morphologische Zelltyp zu erkennen.

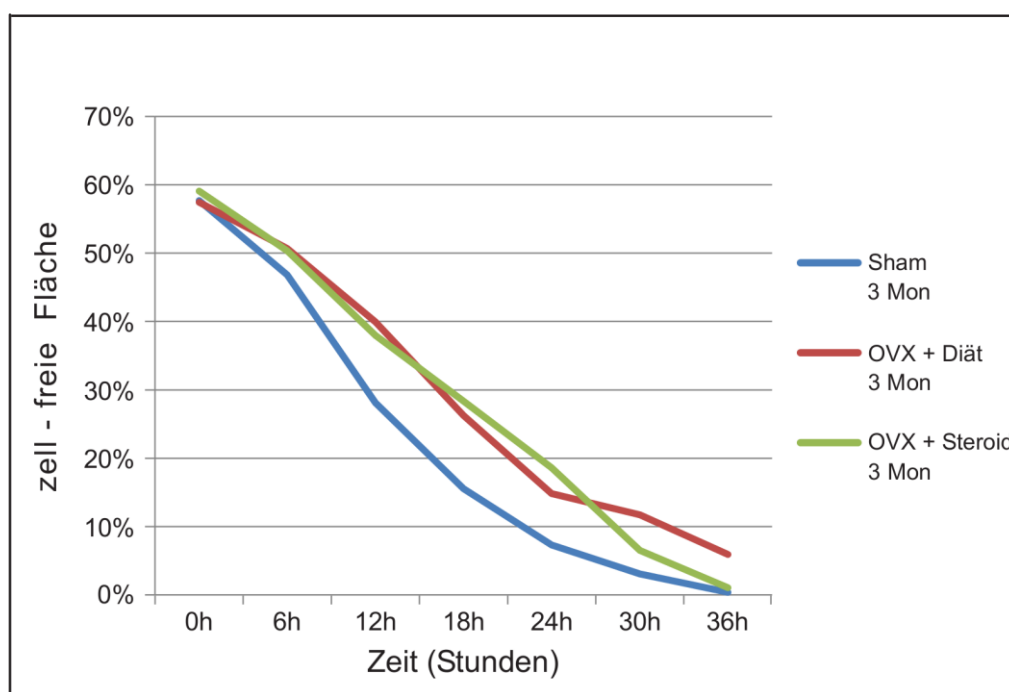
Abbildung 18: Nativaufnahmen des Life-Cell Imaging (Standzeit 3 Monate)



(A) Sham, Zeitpunkt 0h; (B) Sham, Zeitpunkt 12h; (C) Sham, Zeitpunkt 24h; (D) OVX + Steroid, Zeitpunkt 0h; (E) OVX + Steroid, Zeitpunkt 12h; (F) OVX + Steroid, Zeitpunkt 24h; (G) OVX + Diät, Zeitpunkt 0h; (H) OVX + Diät, Zeitpunkt 12h; (I) OVX + Diät, Zeitpunkt 24h

Die Abbildung 19 zeigt die graphische Darstellung nach Auswertung aller fünf individueller Kulturen pro Gruppe. Hierbei zeigt sich, dass die zell-freie Fläche zu Anfang, das heißt Zeitpunkt null Stunden, bei etwa 60 % der gesamten Nativaufnahme liegt. Durch die Verwendung des Culture Inserts konnte eine exakte zell-freie Fläche von etwa 500 μm bei allen Versuchen garantiert werden.

Abbildung 19: Migrationskapazität (Standzeit 3 Monate)



Bei Betrachtung der zell-freien Fläche in Prozent zeigt sich wiederum deutlich die schwächere Migrationskapazität der Gruppen OVX + Diät (rote Linie) und OVX + Steroid (grüne Linie), wobei die Gruppe OVX + Diät die zell-freie Fläche auch nach 36 Stunden noch nicht geschlossen hat. Die nachfolgende Tabelle zeigt die errechneten b-Werte für alle untersuchten MSC der Standzeit 3 Monate.

Tabelle 13: *b*-Werte für die Migrationsgeschwindigkeit (Standzeit 3 Monate)

Gruppe	Tier-Nummer	b-Wert
Sham	Ra 132_10	-0,124169
Sham	Ra 133_10	-0,174218
Sham	Ra 134_10	-0,212017
Sham	Ra 101_11	-0,319737
Sham	Ra 103_11	-0,167457
OVX + Diät	Ra 106_10	-0,163143
OVX + Diät	Ra 108_10	-0,036151
OVX + Diät	Ra 109_10	-0,179354
OVX + Diät	Ra 111_10	-0,280731
OVX + Steroid	Ra 112_10	-0,13742
OVX + Steroid	Ra 113_10	-0,137011
OVX + Steroid	Ra 115_10	-0,121245
OVX + Steroid	Ra 116_10	-0,163988
OVX + Steroid	Ra 117_10	-0,132727

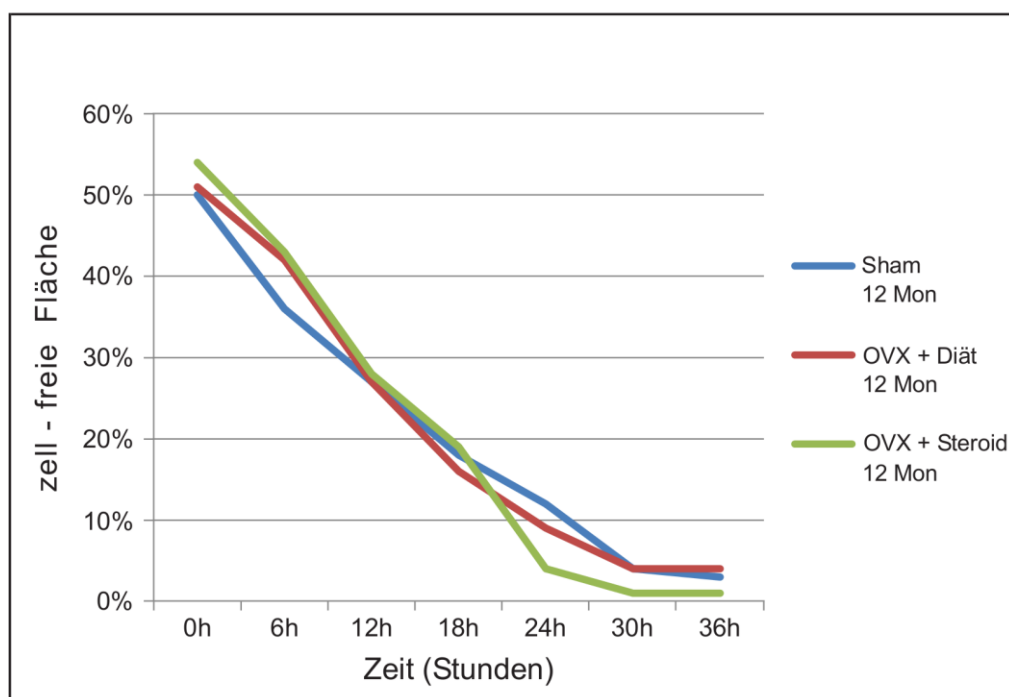
Je niedriger (beziehungsweise je stärker negativ) der *b*-Wert, desto steiler ist die beschriebene Kurve, das heißt desto schneller war die Migration.

Die Ratte 108_10 der Gruppe OVX + Diät mit einem *b*-Wert von -0,036151 zeigte eine langsame Migration, wo hingegen die Ra 101_11 der Kontroll-Gruppe Sham mit einem *b*-Wert von -0,319737 eine sehr schnelle Migration zur Schließung der Lücke aufzeigte. Ebenfalls erkennbar an diesen Daten sind wiederum die starken inter-individuellen Schwankungen innerhalb der Gruppen, nichts desto trotz lassen sich für die MSC der Standzeit drei Monate deutliche Tendenzen aufzeigen.

4.6.2 Migrationskapazität: Standzeit 12 Monate

Die MSC, die nach 12 Monaten Standzeit isoliert wurden, zeigten keine deutlichen Unterschiede in der Migrationskapazität. Alle MSC, gleich aus welcher Gruppe, zeigten ein gutes Migrationsvermögen. Die Abbildung 20 zeigt die Kurven für die Migration aller untersuchten Kulturen.

Abbildung 20: Migrationskapazität (Standzeit 12 Monate)



In der folgenden Tabelle sind die b-Werte als Maß für die Migrationsgeschwindigkeit der MSC der Standzeit 12 Monate aufgelistet.

Tabelle 14: b-Werte für die Migrationsgeschwindigkeit (Standzeit 12 Monate)

Gruppe	Tier-Nummer	b-Wert
Sham	Ra 55_11	-0,093554
Sham	Ra 56_11	-0,153806
Sham	Ra 57_11	-0,177843
Sham	Ra 58_11	-0,12343
OVX + Diät	Ra 42_11	-0,280338
OVX + Diät	Ra 43_11	-0,173882
OVX + Diät	Ra 60_11	-0,166866
OVX + Diät	Ra 61_11	-0,048007
OVX + Steroid	Ra 66_11	-0,180535
OVX + Steroid	Ra 67_11	-0,174533
OVX + Steroid	Ra 68_11	-0,163066
OVX + Steroid	Ra 69_11	-0,157492

Die errechneten b-Werte für die einzelnen Migrations-Versuche liegen für alle Gruppen eng beieinander.

4.7 Statistische Ergebnisse

4.7.1 Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse

Die dreifaktorielle Varianzanalyse wurde an Daten, die aus Versuchen der osteogenen Differenzierung stammten, durchgeführt. Anhand dieser Berechnung konnte der Einfluss der Zellbehandlung, also Inkubation mit osteogenem Differenzierungsmedium oder Basismedium, überprüft werden. Die nachfolgende Tabelle zeigt die p-Werte für die Haupteffekte, Zweifach- und Dreifachwechselwirkungen für die Variablen aus Versuchen der osteogenen Differenzierung wie der Calcium-Messung und der mRNA-Expression der osteogenen Differenzierungsmarker ALP, BSP, OC und RUNX2.

Tabelle 15: p-Werte der dreifaktoriellen Varianzanalyse

Variable	Haupteffekte (p-Werte)			Zweifachwechselwirkungen (p-Werte)			Dreifachwechselwirkungen (p-Werte)
	Behandlung	Standzeit	Zellbehandlung (OD-NC)	Behandlung x Standzeit	Behandlung x Zellbehandlung	Zellbehandlung x Standzeit	Behandlung x Standzeit x Zellbehandlung
Calcium	0,682	0,594	<0,0001*	0,669	0,451	0,652	0,724
ALP	0,505	0,689	<0,0001*	0,215	0,698	0,064	0,820
BSP	0,634	0,320	<0,0001*	0,233	0,947	0,533	0,082
OC	0,908	0,880	<0,0001*	0,013*	0,510	0,412	0,0507
RUNX2	0,839	0,684	<0,0001*	0,021*	0,582	0,629	0,229

Behandlung = Osteoporose-Induktion (OVX + Diät/ Steroid) bzw. Kontrolle (Sham); Standzeit = 3 bzw. 12 Monate; Zellbehandlung = Osteogene Differenzierung bzw. Negativkontrolle;

* = signifikant, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% = $p \leq 0,05$

Ein p-Wert von $\leq 0,05$ gilt als signifikant. Die p-Werte des Haupteffektes Zellbehandlung liegen für jede Variable unter 0,0001, das heißt der Unterschied zwischen osteogen differenzierten Zellen und den Negativkontrollen ist immer hoch signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen die Methode der osteogenen Induktion der Zellen. Die Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium führte immer zu einer deutlichen osteogenen Differenzierung der Zellen im Vergleich zu Zellen, die in Basismedium inkubiert wurden (= Negativkontrolle).

Des Weiteren sind die Zweifachwechselwirkungen zwischen Behandlung und Standzeit im Falle von OC und RUNX2 signifikant. Dies bedeutet, dass der Unterschied zwischen den Standzeiten Behandlungs-abhängig ist.

4.7.2 Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse

Die zweifaktorielle Varianzanalyse wurde an sämtlichen Daten aus den Versuchen zur osteogenen Differenzierungskapazität, zum Proliferationsvermögen sowie zur Migrationskapazität durchgeführt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die p-Werte für die Haupteffekte Behandlung und Standzeit sowie für die Wechselwirkung zwischen Behandlung und Standzeit.

Tabelle 16: p-Werte der zweifaktoriellen Varianzanalyse

Variable	Haupteffekte (p-Werte)		Wechselwirkung (p-Werte) Behandlung x Standzeit
	Behandlung	Standzeit	
Calcium-Wert, OD	0,946	0,910	0,403
Calcium-Wert, NC	0,421	0,533	0,973
ALP, OD	0,432	0,553	0,351
ALP, NC	0,721	0,183	0,242
BSP, OD	0,594	0,239	0,656
BSP, NC	0,744	0,494	0,077
OC, OD	0,730	0,756	0,020*
OC, NC	0,500	0,109	0,108
RUNX2, OD	0,819	0,970	0,423
RUNX2, NC	0,642	0,510	0,004*
Proliferationsfaktor (MTT)	0,818	0,188	0,269
b-Wert (Migration)	0,879	0,705	0,326

Behandlung = Osteoporose-Induktion (OVX + Diät/ Steroid) bzw. Kontrolle (Sham); Standzeit = 3 bzw. 12 Monate;

* = signifikant, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% = $p \leq 0,05$

Ein signifikanter Einfluss der Behandlung, also der Osteoporose-Induktion, auf die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks konnte in der zweifaktoriellen Varianzanalyse nicht nachgewiesen werden. Lediglich die Interaktionen zwischen Behandlung und Standzeit sind im Falle der Osteocalcin-Expression der osteogen differenzierten Zellen und der RUNX2-Expression der nicht osteogen differenzierten Zellen signifikant. Der Unterschied zwischen den Standzeiten ist in diesen Fällen Behandlungs-abhängig. Um diesen Zusammenhang genauer zu überprüfen, wurde für diese Variablen eine einfaktorielle Varianzanalyse ange-

geschlossen, um den Einfluss der Osteoporose-Induktion auf die MSC für die einzelnen Standzeiten getrennt zu bestimmen.

4.7.3 Ergebnisse der einfaktoriellen Varianzanalyse

Für die Variablen OC OD und RUNX2 NC wurde aufgrund der signifikanten p-Werte in der Interaktion von Behandlung und Standzeit eine einfaktorielle Varianzanalyse angeschlossen.

Hierbei zeigte sich für die Standzeit drei Monate ein globaler signifikanter p-Wert von 0,0058 für die Expression von RUNX2 in den undifferenzierten Zellen.

Die Tabelle 17 zeigt das Ergebnis des angeschlossenen Tukey-Tests. Anhand des Tukey-Tests kann bestimmt werden, wie sich die Signifikanzen der einzelnen Gruppen im Vergleich zueinander verhalten.

Tabelle 17: Tukey-Test RUNX2 NC (Standzeit 3 Monate)

	OVX + Diät	OVX + Steroid	Sham
OVX + Diät	-	*	**
OVX + Steroid	*	-	-
Sham	**	-	-

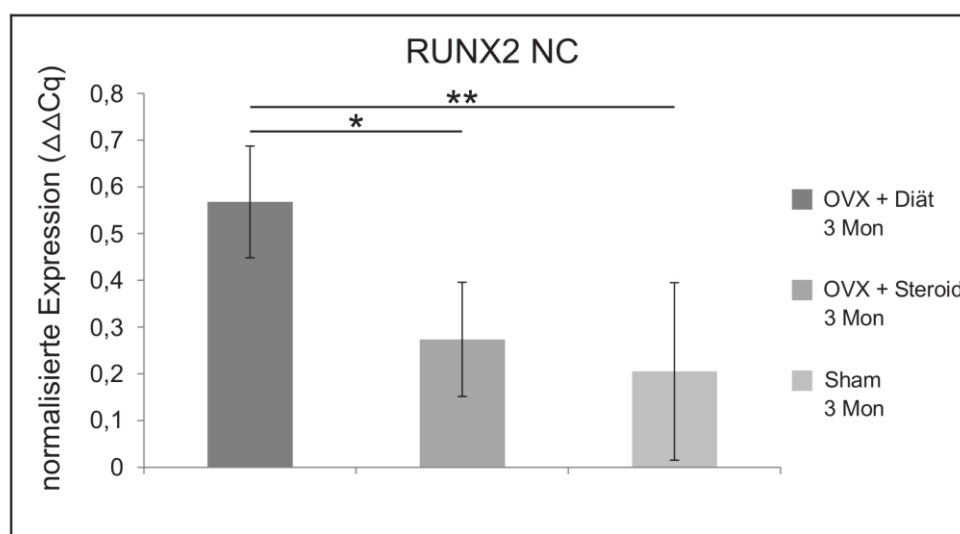
** = 1% Level; * = 5 % Level

Die undifferenzierten MSC der Gruppe OVX + Diät zeigten die höchste mRNA-Expression von RUNX2, gefolgt von MSC der Gruppe OVX + Steroid. Die undifferenzierten MSC der Sham-Gruppe wiesen die niedrigste mRNA-Expression von RUNX2 auf.

Die deutlichsten Unterschiede mit einem 1% Level zeigen sich zwischen der Gruppe OVX + Diät und der Kontroll-Gruppe Sham. Zwischen den Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid zeigt sich ein 5% Level.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Expression für RUNX2 der undifferenzierten MSC mit eingetragenen Signifikanz-Leveln.

Abbildung 21: Signifikanz-Level der Expression RUNX2 undifferenzierter MSC (Standzeit 3 Monate)



NC = Negativkontrollen (undifferenzierte MSC), *: 5% Level; **: 1% Level

Für die Standzeit zwölf Monate war der globale p-Wert von 0,0468 für die Expression von Osteocalcin der osteogen differenzierten Zellen signifikant. Die Tabelle 18 zeigt das Ergebnis des anschließend durchgeführten Tukey-Tests.

Tabelle 18: Tukey-Test OC OD (Standzeit 12 Monate)

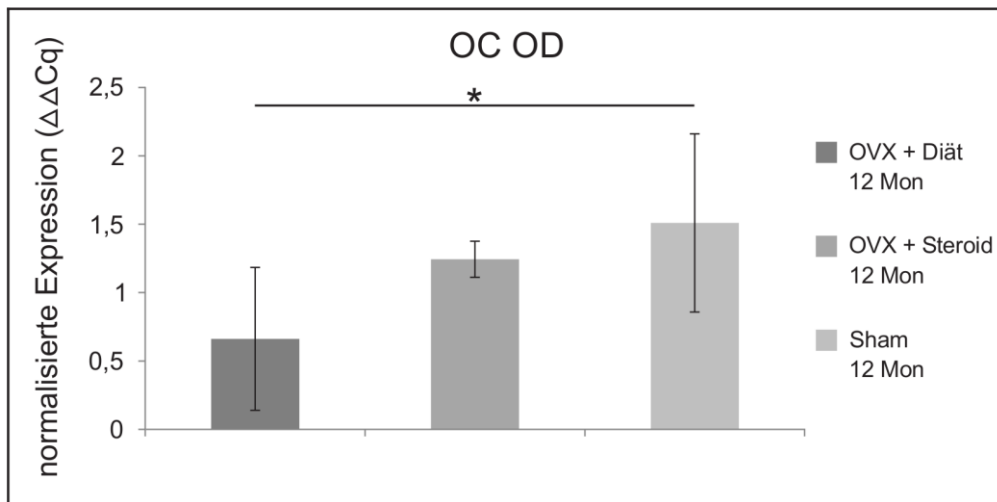
	OVX + Diät	OVX + Steroid	Sham
OVX + Diät	-	-	*
OVX + Steroid	-	-	-
Sham	*	-	-

** = 1% Level; * = 5 % Level

Die osteogen differenzierten Zellen der Kontroll-Gruppe Sham wiesen die höchste mRNA-Expression von Osteocalcin auf, gefolgt von der Gruppe OVX + Steroid. Osteogen differenzierte Zellen der Gruppe OVX + Diät zeigten die niedrigsten mRNA-Expression von Osteocalcin. Hierbei zeigen sich zwischen der Gruppe OVX + Diät und der Sham Gruppe Unterschiede mit einem 5% Level.

Die Abbildung 22 zeigt die RNA-Expression für Osteocalcin der osteogen differenzierten Zellen mit den eingetragenen Signifikanzen.

Abbildung 22: Signifikanz-Level für die Osteocalcin-Expression osteogen differenzierter MSC (Standzeit 12 Monate)



OD = Osteogen differenziert, *: 5% Level

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 Das Tiermodell

Das hier untersuchte Modell der ovariectomierten Ratte ist das am häufigsten verwendete Tiermodell für Osteoporose (Lelovas 2008; Egermann et al. 2005). Die Kombination der Ovariectomie mit spezifischen Calcium-restriktiven Diäten beziehungsweise mit Glucocorticoiden ist zur Verstärkung der Effekte ebenfalls üblich (Egermann et al. 2005; Koshihara et al. 2004; Lill et al. 2002; Nitta et al. 1999; Shen et al. 1997). Ziel des Teilprojektes T1 „Etablierung und Qualitätssicherung osteoporotischer Tiermodelle“ ist daher die Beurteilung der Induktionsmethoden Ovariectomie in Kombination mit einer Calcium-defizitären Diät oder einem Steroid zu zudem unterschiedlichen Standzeiten. Diese Untersuchungen sollen tiefergehende Erkenntnisse liefern, um für zukünftige Biokompatibilitätsüberprüfungen neu generierter Werkstoffe für den systemisch erkrankten Knochen ein standardisiertes Modell etablieren zu können. In weiteren Teilprojekten des Transregio 79 wurden vielfache Untersuchungen an Proben dieser Ratten durchgeführt. Es erfolgten unter Anderem DEXA-Messungen (Heiss et al. 2012), histomorphometrische und biomechanische Analysen, RNA-Expressionsanalysen, hämatologische Untersuchungen sowie die hier dargestellte Charakterisierung der MSC des Knochenmarks. Nach Auswertung all dieser Ergebnisse wird eine detaillierte Beschreibung der Effekte durch die unterschiedlichen Induktionsmethoden angestrebt.

Die Kombination der Ovariectomie mit der Gabe von Glucocorticoiden lieferte in verschiedenen Studien widersprüchliche Ergebnisse (Nitta et al. 1999; Shen et al. 1997). An den im Teilprojekt T1 untersuchten Ratten wurde durch die Gabe des Glucocorticoids Dexamethason eine reduzierte Knochendichte festgestellt, die Effekte in der Gruppe OVX + Steroid waren jedoch deutlich geringer ausgeprägt als in der Gruppe OVX + Diät (Heiss et al. 2012). Auch in den hier diskutierten Ergebnissen der Charakterisierung der MSC waren die deutlichsten Effekte in der Gruppe OVX + Diät zu beobachten.

Für das hier untersuchte Versuchsmodell sind teilweise Limitationen zu diskutieren. Durch das Fehlen einer Gruppe OVX, also lediglich ovariectomisierte Ratten, sind die Effekte der Kombinationen mit der Diät oder dem Steroid nicht zu beurteilen. Es kann anhand der Daten nicht entschieden werden, welche Auswirkungen Resultate der Ovariectomie, der Diät oder des Steroids sind. Die Bedeutung ausreichender Kontrollen ist für die Beurteilung von Tiermodellen essentiell, um die Effekte den Ursachen zuordnen zu können (Lelovas 2008; Jee W.S.S. 2001). Des Weiteren wäre gegebenenfalls eine zusätzliche Standzeit von sechs Monaten, für eine genauere Analyse des zeitlichen Verlaufes, von Vorteil gewesen. Die Beurteilung der Langzeiteffekte nach zwölf Monaten ist schwierig, da sich beispielsweise die Anzeichen des Knochenumsatzes des spongiösen Knochens denen der Kontrollen anpassen (Thompson et al. 1995). Thompson empfiehlt daher, Studien auf Standzeiten zu beschränken, die weniger als zwölf oder womöglich sechs Monate betragen (Thompson et al. 1995).

5.1.2 Isolierung und Kultivierung der MSC

Zur Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark unterschiedlicher Osteoporose-Modelle der Ratte wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Methoden angewendet. Die MSC wurden nach ihrer Morphologie, ihrer Proliferationskapazität, ihrer Fähigkeit zur Migration sowie nach ihrer osteogenen Differenzierungskapazität näher beschrieben.

Eine häufig diskutierte Problematik in der Forschung an Stammzellen sind zum Einen die vielzähligen Methoden der Isolierung dieser Zellen sowie zum Anderen die unterschiedlichen Gewebearten, die zur Gewinnung mesenchymaler Stammzellen herangezogen werden können. Hierdurch ist es sehr schwierig, Ergebnisse verschiedener Studien miteinander vergleichen zu können. Aus diesem Grund wurden „Minimal-Kriterien für mesenchymale Stammzellen“ formuliert (Dominici et al. 2006). Zu diesen Kriterien zählen die Plastik-Adhärenz, die Expression der Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 sowie die Fähigkeit in die osteogene, adipogene und chondrogene Linie zu differenzieren (Dominici et al. 2006; Chamberlain et al. 2007; Uccelli et al. 2008). Die Expression der Oberflächenmarker variiert jedoch zwischen verschiedenen Spezies und ist abhängig vom

Einfluss von Faktoren akzessorischer Zellen sowie von Kulturbedingungen (Uccelli et al. 2008; Chamberlain et al. 2007).

Die Isolierung und Kultivierung der MSC aus dem Knochenmark der Ratten wurde auf Grundlage einer etablierten Methode (Arnhold et al. 2007; Arnhold et al. 2006) durchgeführt. Die aus dem Knochenmark der Ratten isolierten Zellen konnten aufgrund ihrer Eigenschaften wie Plastik-Adhärenz, Differenzierungskapazität in die adipogene und osteogene Linie sowie der Expression der Stammzellmarker CD90 und CD105 als mesenchymale Stammzellen definiert werden (Dominici et al. 2006; Rastegar et al. 2010).

Die Unterschiede zwischen osteogen differenzierten Zellen und MSC, die in Basismedium inkubiert wurden, waren für alle untersuchten Parameter hoch signifikant. Hierdurch kann die in vitro durchgeführte osteogene Differenzierung als verlässliche Methode bestätigt werden. Darüber hinaus ist somit die Fähigkeit der MSC, in die osteogene Linie zu differenzieren, eindeutig belegt.

Um die Vergleichbarkeit aller Ergebnisse der vorliegenden Studie sicherzustellen wurden alle MSC unter den gleichen Bedingungen kultiviert und die Untersuchungen einheitlich in der dritten Passage durchgeführt.

5.2 Die Morphologie der isolierten MSC

Die Morphologie mesenchymaler Stammzellen wird in der Literatur als heterogen beschrieben. Zum Einen finden sich in den Kulturen spindelzellförmige Zellen, zum Anderen auch größere, kubische Zellen (Friedenstein et al. 1968; Chamberlain et al. 2007; Colter 2001; Tuli R. 2003; Uccelli et al. 2008).

Diese beiden Zelltypen konnten auch in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen werden. Auffallend war hierbei jedoch, dass die MSC der behandelten Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid, die nach drei Monaten Standzeit isoliert wurden, wesentlich höhere Anteile des großen, flachen Zelltyps aufzeigten als die MSC der Kontroll-Gruppe Sham. Der große, flache Zelltyp wird in verschiedenen Studien als die Morphologie von gealterten MSC beschrieben, die sich in einem Stadium der replikativen Seneszenz befinden (Tuli R. 2003; Asumda und Chase 2011). In einer Studie von Asumda und Chase wurden MSC aus dem Knochenmark von jungen und alten Ratten verglichen und festgestellt, dass MSC von jungen Ratten eine spindelzellförmige Morphologie aufwiesen, wo hingegen die

MSC der alten Ratten eher vom großen, flachen Zelltyp waren (Asumda und Chase 2011). Diese Erkenntnisse deuten möglicherweise daraufhin, dass die MSC der Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid sich in einem Stadium der frühzeitigen Alterung befinden. Die Osteoporose-Induktion mittels Ovariectomie in Kombination mit der Gabe der Calcium-restriktiven Diät beziehungsweise von Dexamethason führte vermutlich zu einer rapideren Alterung des Stammzellpools im Knochenmark dieser Tiere. Diese Hypothese beruht jedoch lediglich auf der Betrachtung der Morphologie der MSC. Zur Bestätigung wären weitere Untersuchungen von Nöten, wie beispielsweise die Expression spezifischer Seneszenz-Marker wie der Beta-Galaktosidase (Stenderup et al. 2003).

Die nach zwölf Monaten Standzeit isolierten MSC zeigten ebenso ein heterogenes morphologisches Bild bestehend aus spindelförmigen und großen flachen Zellen. Allerdings waren hier nun zwischen den Gruppen Sham, OVX + Diät und OVX + Steroid keine Unterschiede mehr zu erkennen. Auch in der Kontroll-Gruppe Sham waren größere, flache Zellen zu finden.

Da es sich bei den Ratten der Gruppe Sham um Tiere mit einem hohen Alter von zwölf Monaten und 14 Wochen handelt, entsprechen diese Ergebnisse der Studie von Asumda und Chase, die in Zellkulturen von 15 Monate alten Ratten ebenfalls vermehrt große, flache Zellmorphologien beobachteten im Vergleich zu spindelförmigen MSC von jungen Ratten mit einem Alter von vier Monaten (Asumda und Chase 2011).

Alle Gruppen zeigten Zellkulturen mit beiden Zellmorphologien, wobei hier der Anteil der großen Zellen nicht so hoch war wie in den OVX-Gruppen der Standzeit drei Monate. Der Anteil an großen, flachen, vermutlich gealterten MSC in den ovariectomierten Tieren ist im Vergleich zur Standzeit drei Monate wieder gesunken. Möglicherweise ist der Stammzellpool des Knochenmarks durch seine starke phänotypische Plastizität in der Lage sich wieder zu regenerieren.

Durch Anfärbung der undifferenzierten MSC mittels Oil Red O Färbung fiel auf, dass die MSC der ovariectomierten Ratten nach drei Monaten Standzeit vermehrt Fettvakuolen im Zytoplasma aufwiesen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Diese morphologischen Veränderungen könnten auf eine Differenzierung der MSC in die adipogene Linie hindeuten. Zwischen der osteogenen und der adipogenen Linie besteht ein inverses Verhältnis und das Krankheitsbild der Osteoporose wird

mit einem Ungleichgewicht im Differenzierungspotential der MSC, und zwar durch vermehrte adipogene Differenzierung, in Verbindung gebracht (Nuttall et al. 1998). Die Funktionen der Adipozyten des Knochenmarks sind komplex und nicht vollständig geklärt. Folgende Hypothesen werden von J.M. Gimble formuliert (Gimble et al. 1996):

- Adipozyten fungieren als Platzhalter im Knochenmark.
- Adipozyten bilden ein lokales Energiereservoir im Knochenmark.
- Adipozyten spielen eine aktive Rolle im Lipid-Metabolismus.
- Adipozyten haben möglicherweise einen Einfluss auf die Osteogenese.

Die Beziehungen zwischen den unterschiedlichen Linien der MSC sind noch nicht vollends geklärt. Die MSC im Knochenmark können zu Adipozyten oder Osteoblasten differenzieren, sich aber auch wieder dedifferenzieren (Bennett et al. 1991). Möglicherweise teilen sich verschiedene Phänotypen auch bestimmte Eigenschaften und Funktionen (Gimble et al. 1996).

An ovariectomierten Ratten wurde ein reziprokes Verhältnis zwischen Knochenmarks-Fettgehalt und Knochenformationsrate festgestellt (Martin und Zissimos 1991; Heiss et al. 2012). Die Studie von Heiss et. al erfolgte an den gleichen Ratten aus dem Teilprojekt T1 wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Hierbei wurde an verschiedenen Stellen des Skeletts dieser Tiere eine DEXA-Messung vorgenommen. Die Ergebnisse der Analysen zeigten einen Anstieg des anteiligen Fettgehalts bei den ovariectomierten Ratten (Heiss et al. 2012). Diese Untersuchungen untermauern die formulierte Hypothese, dass die MSC der ovariectomierten Ratten sich möglicherweise in einem Status der adipogenen Differenzierung befinden. Eine Möglichkeit diese Hypothese weiter abzuklären wären zum Beispiel RNA- und Proteinexpressionsanalysen adipogener Differenzierungsmarker der undifferenzierten MSC.

Östrogen beeinflusst die MSC im Knochenmark und wirkt fördernd auf die Osteogenese und hemmend auf die Adipogenese (Gimble et al. 1996). Durch den Wegfall der Östrogenwirkung bei den ovariectomierten Ratten wird vermutlich die adipogene Differenzierung verstärkt. Bei MSC ovariectomierter sechs Monate alter Ratten wurden eine verminderte osteogene und eine erhöhte adipogene Differenzierungskapazität festgestellt. Durch das Östrogendefizit war die Serumkon-

zentration an Cortisol bei den ovariectomierten Tieren erhöht. Nach Behandlung der Ratten mit einem Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten konnten diese Effekte aufgehoben werden. In dieser Studie wurde der erhöhte Cortisol-Spiegel mit einer frühzeitigen Alterung der MSC in Verbindung gebracht (Wei et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Studie stimmen teilweise mit den hier dargestellten Ergebnissen überein, allerdings ist die Vergleichbarkeit aufgrund des unterschiedlichen Alters der Tiere nicht vollständig gegeben.

Die Adipozyten des Knochenmarks könnten im Sinne einer lokalen Östrogenquelle (Gimble et al. 1996) als mögliche Gegenregulation auf das Östrogendefizit fungieren. Frisch et. al konnten zeigen, dass das Fettmark von Frauen aus Femur und Hüftbein in der Lage ist, Androgene in Östrogen umzuwandeln (Frisch et al. 1980).

Es ist bekannt, dass Glucocorticoide das Differenzierungsverhalten mesenchymaler Stammzellen beeinflussen, sie induzieren einen Shift zur adipogenen Differenzierung (Pereira et al. 2002). Dieser Mechanismus könnte die vermehrt auftretenden Fettvakuolen in MSC der Gruppe OVX + Steroid erklären.

Die nach zwölf Monaten Standzeit isolierten MSC zeigten allesamt, gleich ob aus der Kontroll-Gruppe Sham oder den Gruppen OVX + Diät oder OVX + Steroid, viele Fettvakuolen im Zytoplasma. Auch die MSC der Sham-Gruppe wiesen viele Fettvakuolen auf. Der höhere Anteil an Adipozyten im Knochenmark als sogenanntes Fettmark ist ein typisches Bild im Alter (Gimble et al. 1996). So konnten Wilson et. al an gealterten murinen MSC eine erhöhte Expression adipogener Marker feststellen (Wilson et al. 2010). Ebenso zeigt sich bei der SAMP-6 Maus, einem Modell frühzeitiger Alterung, eine verstärkte Adipogenese (Kajkenova et al. 1997).

Zusammenfassend die MSC der Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid der Standzeit drei Monate betrachtend lassen sich folgende Interpretationen formulieren:

- Durch das Östrogendefizit zeigen die MSC der ovariectomierten Ratten einen Phänotyp, der für eine adipogene Differenzierung spricht.
- Durch die Gabe des Glucocorticoids in der Gruppe OVX + Steroid werden die MSC zu einem Shift in die adipogene Linie aktiviert.
- Die Osteoporose-Induktion durch Ovariectomie in Kombination mit einer Calcium-defizitären Diät beziehungsweise Steroidgabe führt zu einer früh-

zeitigen Alterung der MSC, dargestellt durch die Morphologie der MSC mit vielen Fettvakuolen.

Bei nach zwölf Monaten Standzeit isolierten Zellen lassen sich keine morphologischen Unterschiede mehr feststellen, auch im Zytoplasma der MSC der Kontroll-Gruppe finden sich viele Fettvakuolen als mögliches Zeichen der Alterung.

5.3 Die Proliferationskapazität der MSC

Die Proliferationskapazität der MSC und somit die Aufrechterhaltung und Erneuerung des Stammzellpools sind wesentliche Komponenten für die osteogene Regeneration. Ein Zusammenhang zwischen der Entstehung der Osteoporose und einer verringerten Anzahl der MSC des Knochenmarks ist somit möglich. In unterschiedlichen Studien, sowohl an humanen MSC als auch an MSC aus Tiermodellen, wird daher ein Augenmerk auf die Proliferationskapazität der MSC des Knochenmarks gelegt (Benisch et al. 2012; Kassem et al. 1997; Rodriguez et al. 1999; Torricelli et al. 2000b). Untersuchungen an MSC oder Osteoblasten von Osteoporose-Patienten zeigten eine verminderte proliferative Aktivität dieser Zellen (Rodriguez et al. 1999; Kassem et al. 1997; Benisch et al. 2012). Auch MSC ovariectomierter Ratten und Schafe anderer Studien zeigten eine verminderte Proliferationskapazität (Torricelli et al. 2000b; Torricelli et al. 2000a; Wei et al. 2012).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine verminderte Proliferationskapazität bei MSC der Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid der Standzeit drei Monate. Auf diesen Aspekt bezogen scheint durch die Induktionsmethoden nach drei Monaten Standzeit eine zur humanen Osteoporose vergleichbare Situation der MSC bezüglich der proliferativen Aktivität entstanden zu sein. Die niedrigste Proliferationskapazität zeigt hierbei die Gruppe OVX + Diät. In der statistischen Bewertung dieser Daten zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Ursächlich hierfür sind die starken interindividuellen Schwankungen zwischen den einzelnen Ratten der Gruppen. Dennoch kann man anhand der dargestellten Ergebnisse klare Tendenzen ablesen. Durch eine Erhöhung der Stichprobenanzahl wären möglicherweise signifikante Unterschiede zu bestimmen. Zudem werden beachtliche Variationen zwischen

unterschiedlichen Spendern in vielen Studien an MSC beschrieben und stellen somit ein sehr häufiges Problem dar (Wei et al. 2012; Moroni und Fornasari 2012; Benisch et al. 2012).

Nach zwölf Monaten Standzeit isolierte MSC zeigten keine Unterschiede in der proliferativen Aktivität zwischen den Gruppen Sham, OVX + Diät und OVX + Steroid, ähnlich wie im Falle der Morphologie. Die proliferative Aktivität der MSC scheint hier durch die Induktionsmethoden nicht mehr beeinträchtigt.

Eine reduzierte Proliferationskapazität wird häufig auch für MSC alter Patienten oder Versuchstiere beschrieben. Stenderup et. al wiesen eine verminderte Proliferation der MSC von Spendern mit einem Alter von 68 bis 81 Jahre nach, im Vergleich zu MSC junger Spender mit einem Alter von 18 bis 29 Jahre (Stenderup et al. 2003). Korrespondierend ist die Anzahl MSC in alten Ratten im Vergleich zu jungen Tieren erniedrigt (Yue et al. 2005) und bei murinen MSC alter Tiere ist die Expression von Zellzyklusregulatoren reduziert (Wilson et al. 2010).

Die reduzierte Proliferationskapazität der MSC der behandelten Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid der Standzeit drei Monate deckt sich mit den gefundenen morphologischen Veränderungen. Der in diesen Kulturen vermehrt vorgefundene große, flache Zelltyp wird als gealterte Zellen in einem Status replikativer Seneszenz beschrieben (Tuli R. 2003). Die gemeinsame Betrachtung der Morphologie und der Proliferationskapazität unterstützt folglich die Hypothese, dass durch die angewendeten Induktionsmethoden nach drei Monaten Standzeit eine Form der frühzeitigen Alterung der MSC des Knochenmarks hervorgerufen wurde.

Ein kausaler Zusammenhang zwischen zellulärer Seneszenz und Osteoporose als eine der häufigsten Erkrankungen des höheren Lebensalters wird diskutiert. Battmann beschreibt die zelluläre Seneszenz als Teilkomponente der Entstehung von Knochenmasseverlust. Ein ausschließlich bei Osteoporose auftretender Prozess in dieser Hinsicht ist bislang jedoch nicht nachgewiesen (Battmann et al. 2001).

Die angewendete Methode, der MTT-Test, ist ein gut etabliertes und häufig genutztes Verfahren zur Bestimmung der Proliferationskapazität (Fini et al. 2001; Shell et al. 2012; Tuli R. 2003). Durch die Errechnung des Proliferationsfaktors konnten Schwankungen der Zellzahl zum Zeitpunkt Null ausgeglichen werden, so dass die Verlässlichkeit der Daten gewährleistet werden konnte.

5.4 Die Migrationskapazität der MSC

Mesenchymale Stammzellen sind in der Lage zu migrieren, also sich fortzubewegen (Shi et al. 2012; Castelo-Branco et al. 2012; Chamberlain et al. 2007). Der Mechanismus hierfür ist noch nicht vollständig aufgeklärt, MSC exprimieren jedoch zum Beispiel Adhäsionsmoleküle, wie sie bei der Migration der Leukozyten bekannt sind (Chamberlain et al. 2007). Das heißt, MSC sind im Zuge ihrer Funktion bei der Regeneration in der Lage zum Ort der Schädigung zu wandern. So zeigte eine Studie von Morgana et. al, dass intraperitoneal applizierte MSC zum Ort der Entzündung, in diesem Fall im Zuge einer Colitis zum Colon hin, migrierten (Castelo-Branco et al. 2012). Es stellt sich die Frage, ob diese Funktion im Falle der Osteoporose gestört ist.

In der vorliegenden Arbeit war es daher von großem Interesse, ob im Rattenmodell die Induktion der Osteoporose einen Einfluss auf das Migrationsvermögen der MSC nimmt. Im Falle der nach drei Monaten isolierten Zellen zeigten die MSC der behandelten Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid eine schlechtere Migrationskapazität. Diese MSC benötigten einen längeren Zeitraum, um die zellfreie Fläche zu schließen. Zellen der Gruppe OVX + Diät wiesen die schlechteste Migrationskapazität auf. Im Falle der nach zwölf Monaten isolierten MSC waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen und alle untersuchten MSC zeigten ein gutes Migrationsvermögen. Diese Ergebnisse decken sich erneut mit denen hinsichtlich Morphologie und Proliferation. Die auffallendsten Veränderungen zeigen sich bei MSC der Gruppe OVX + Diät Standzeit drei Monate im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Die Morphologie und das Proliferationsvermögen dieser Zellen entsprechen dem Phänotyp gealterter Stammzellen, das verminderte Migrationsvermögen ist hierzu konform.

Anhand der Phalloidin-färbung wurde die Morphologie des Aktinzytoskeletts dieser MSC beurteilt. Veränderungen in der Ausprägung des Aktinzytoskeletts könnten ursächlich für ein vermindertes Migrationsvermögen sein. Allerdings konnten hierbei in der Betrachtung der Färbung keine Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden. Das Aktinzytoskelett war bei allen MSC deutlich ausgeprägt. Die Ursachen für die Veränderungen in der Migration sind somit anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig zu beurteilen.

In der statistischen Auswertung konnten keine signifikanten Unterschiede belegt werden, was erneut in den hohen inter-individueller Schwankungen begründet ist. Dennoch kann auch hier, insbesondere bei gesammelter Betrachtung der Morphologie, des Proliferationsvermögens und des Migrationsvermögens, für die Standzeit drei Monate ein Einfluss der Osteoporose-Induktion auf die mesenchymalen Stammzellen eindeutig gezeigt werden. Die deutlichsten Unterschiede zur Kontroll-Gruppe sind bei der Gruppe OVX + Diät zu finden.

Die angewendete Methode zur Untersuchung des Migrationsvermögens ist durch die Verwendung des Culture Inserts sehr exakt. Die zellfreie Fläche beträgt konstant ca. 500 μm und somit ist die immer identische Durchführung des Versuches gewährleistet. Durch die zusätzliche Berechnung des b-Wertes konnte ein Maß für die Geschwindigkeit jeder einzelnen Zellkultur pro Ratte definiert werden.

5.5 Das osteogene Differenzierungspotential

5.5.1 Die Methode zur Überprüfung des osteogenen Differenzierungspotential

Die Zusammensetzung des in den Versuchen verwendeten osteogenen Differenzierungsmediums wurde in Vorversuchen an MSC von Kontroll-Ratten getestet. Um eine osteogene Stimulation der MSC zu erreichen war die Zugabe von 2,2 mmol Calciumchlorid von Nöten. Durch die zusätzlich etablierte Negativkontrolle NC1 mit Zugabe von 2,2 mmol Calcium zum Basismedium konnten Fehlinterpretationen aufgrund des zugesetzten Calciums verhindert werden. Die Negativkontrollen NC1 zeigten weder bei der Betrachtung der Von Kossa Färbung noch bei Messung des Calcium-Gehaltes der Zell-Lysate Anzeichen einer osteogenen Differenzierung. Ein Ausfallen von Calcium aus der Lösung des Differenzierungsmediums, welches die Ergebnisse hätte verfälschen können, wurde durch die in Tabelle 10 aufgeführte Messung des Calcium-Gehalts in Zell-Lysat und korrespondierendem Mediumüberstand ausgeschlossen.

Zur umfangreichen Beurteilung der osteogenen Differenzierungskapazität wurden die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen herangezogen. Betrachtet wurden hierbei die Morphologie der differenzierten Zellen in der Von Kossa Färbung, der Gehalt an gebildetem Calcium sowie die Expression spezifischer osteogener

Differenzierungsmarker. Die statistische Auswertung bestätigt zudem die Verlässlichkeit der hier angewendeten Methoden. Die Unterschiede zwischen osteogen differenzierten Zellen und Zellen, die als Negativkontrolle in Basismedium inkubiert wurden, sind für alle untersuchten Parameter hoch signifikant.

Bei den für die quantitative realtime PCR gewählten Primer handelt es sich um klassische und in vielen Studien überprüfte Marker für die osteogene Differenzierung (Hofmann et al. 2009; Karsenty 2000; Ganss et al. 1999; Teven et al. 2011). Diese Primer sind vom Hersteller designt und validiert. In der Schmelzkurvenanalyse der BioRad CFX Manager Software 2.0 sowie mittels Überprüfung der Produktgröße in der Agargelelektrophorese wurden die Primer, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, zusätzlich auf ihre Funktion überprüft.

Mit der Wahl der osteogenen Differenzierungsmarker wurde der Versuch unternommen, unterschiedliche Zeitpunkte der osteogenen Differenzierungskaskade zu beleuchten. Hierzu muss allerdings erwähnt werden, dass die Expression der unterschiedlichen Marker während der osteoblastären Differenzierungskaskade einem komplexen Zusammenspiel entspricht und nicht alle Zellen der Kultur sich während der Differenzierung im selben Reifungsstadium befinden (Hofmann et al. 2009). Die alkalische Phosphatase katalysiert den Prozess der Matrixmineralisation und wird daher schon in einem frühen Stadium der Differenzierung exprimiert (Collin et al. 1992). RUNX2 wird auch schon von Vorläuferzellen der Osteoblasten exprimiert und gilt als sogenannter „Master-Regulator“ der osteogenen Differenzierung (Hofmann et al. 2009; Komori 2006; Karsenty 2000; Teven et al. 2011). BSP wird exprimiert, sobald die Mineralisation einsetzt (Ganss et al. 1999). Osteocalcin wird nur von reifen Osteoblasten gebildet, das heißt OC ist spezifisch für Zellen, die für die Mineralisation eingesetzt sind und ist damit repräsentativ für die späte Phase der osteogenen Differenzierung (Hofmann et al. 2009; Komori 2006).

Die Expression der Marker BSP, OC und RUNX2 wurde durch Inkubation mit osteogenem Differenzierungsmedium in den Zellen wie erwartet erhöht. Nur im Falle der ALP war die Expression in den Negativkontrollen, also in undifferenzierten MSC, höher als in osteogen differenzierten Zellen. Auch bei Betrachtung der Expression zu einem früheren Zeitpunkt, der Differenzierung nach sieben Tagen, zeigte sich, dass die Expression der ALP in den undifferenzierten MSC

höher war. Für dieses Phänomen ist es bislang nicht gelungen eine Erklärung zu finden. Der für die ALP verwendete Primer wurde auf seine erforderlichen Eigenschaften hin, sowohl vom Hersteller aus auch durch in den laufenden Untersuchungen durchgeführte und hier beschriebene Analysen, getestet. Für die humane alkalische Phosphatase sind vier Genloci mit sechs unterschiedlichen Isoformen beschrieben, wobei davon zwei Isoformen knochenspezifisch sind (Magnusson et al. 1998). Collin et. al analysierten eine zusätzliche strukturelle Form der ALP während des Mineralisationsprozesses, die zu Beginn der Differenzierung in der Phase der Zell-Konfluenz nicht nachgewiesen werden konnte (Collin et al. 1992). Die Studie von Collins et al wurde ebenso wie die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an Rattenzellen durchgeführt. Es stellt sich somit die Frage, ob der verwendete Primer möglicherweise nicht in der Lage war, eine solche zusätzliche zweite Isoform der ALP nachzuweisen. Allerdings wird in anderen Studien bislang nur eine Isoform der knochenspezifischen ALP bei der Ratte beschrieben (Dziedziejko et al. 2009).

5.5.2 Die Ergebnisse zum osteogenen Differenzierungspotential

5.5.2.1 Das osteogene Differenzierungspotential der MSC nach drei Monaten Standzeit

Bei Betrachtung der Zellen nach drei Monaten Standzeit zeigten die MSC der ovariectomierten Ratten der Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid ein stärkeres osteogenes Differenzierungspotential als Zellen der Kontroll-Gruppe Sham. Bei allen untersuchten Parametern, also in der morphologischen Beurteilung der Von Kossa Färbung, im Falle der Calcium-Messung, sowie bei allen untersuchten Expressionsmarkern in der quantitativen PCR wiesen die Zellen der Gruppe OVX + Diät das stärkste osteogene Differenzierungsvermögen auf. MSC der Gruppe OVX + Steroid demonstrierten in der Von Kossa Färbung, der Calcium-Messung sowie bei den Markern RUNX2 und ALP ein höheres osteogenes Differenzierungsvermögen als MSC der Sham-Gruppe.

Diese Ergebnisse belegen, dass nach drei Monaten Standzeit die osteogene Differenzierungskapazität der MSC durch die Induktionsmethoden OVX + Diät beziehungsweise OVX + Steroid nicht beeinträchtigt wurde. Ganz im Gegenteil zeigten

diese MSC ein höheres Differenzierungsvermögen als MSC gesunder Ratten. Möglicherweise befinden sich die MSC der ovariectomierten Ratten bereits in einem zur osteogenen Linie hin aktivierten Zustand, um dem in der DEXA-Messung (Heiss et al. 2012) deutlich zu erkennenden Knochenmasseverlust entgegenzuwirken. Hierfür spricht zudem der hochsignifikante Unterschied in der RUNX2 Expression der undifferenzierten MSC zwischen den Gruppen Sham und OVX + Diät. Die MSC der Gruppe OVX + Diät zeigen auch im in vitro undifferenzierten Zustand eine signifikant höhere RUNX2 Expression. Dies könnte dafür sprechen, dass diese MSC bereits in vivo durch den stattfindenden Knochenmasseverlust verstärkt in die osteogene Linie aktiviert wurden.

Diese Ergebnisse der osteogenen Differenzierung können auch mit den Erkenntnissen aus den Versuchen zur Proliferation in einen Zusammenhang gebracht werden. Die MSC der ovariectomierten Ratten zeigen nach drei Monaten Standzeit ein erhöhtes osteogenes Differenzierungsvermögen und eine verminderte Proliferationskapazität im Vergleich zu MSC der Kontroll-Gruppe Sham. Das Phänomen, dass sich die osteogene Differenzierungskapazität und die Proliferationskapazität von MSC zueinander gegenläufig verhalten, ist in mehreren Studien an humanen MSC beschrieben (Fromigue et al. 1998; Liu et al. 1999; Lecanda et al. 1997). Das Verhalten der MSC wird von lokalen Faktoren beeinflusst. Zum Beispiel bewirkt der Faktor BMP-2 (von engl.: Bone Morphogenetic Protein-2) eine Stimulation der osteogenen Differenzierung und gleichzeitig eine Inhibierung der Proliferation (Lecanda et al. 1997; Fromigue et al. 1998). Im Gegenzug dazu steigert der Wachstumsfaktor TGF- β die Proliferation der MSC und verursacht einen Abfall in der Expression der ALP (Fromigue et al. 1998; Liu et al. 1999). Durch Vitamin D3 kann das osteogene Differenzierungsvermögen humaner MSC gesteigert werden und die Proliferation der Zellen wird inhibiert (Liu et al. 1999). Diese Studien unterstützen die These, dass die MSC der ovariectomierten Ratten der vorliegenden Arbeit sich durch die Induktionsmethoden in einem Status der aktivierten osteogenen Differenzierung befinden und das Proliferationsvermögen in diesem Zusammenhang damit reduziert ist.

5.5.2.2 Das osteogene Differenzierungspotential der MSC nach zwölf Monaten Standzeit

Nach zwölf Monaten Standzeit fanden sich bei den MSC im Gegensatz zu den nach drei Monaten isolierten Zellen gegensätzliche Ergebnisse zum osteogenen Differenzierungspotential. Hier zeigten die MSC der Kontroll-Gruppe Sham in der Von Kossa Färbung und in der höheren Expression der Marker OC und RUNX2 ein besseres Differenzierungsvermögen als MSC der Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid. MSC der Gruppe OVX + Diät wiesen bei diesen Parametern die niedrigsten Expressionen auf. Geringe Unterschiede finden sich in der Calcium-Messung sowie in der Expression des Markers BSP. Die statistische Analyse der Daten zeigte einen signifikanten Unterschied in der OC Expression der osteogen differenzierten Zellen zwischen den Gruppen Sham und OVX + Diät. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das osteogene Differenzierungsvermögen der MSC durch die Induktionsmethoden OVX + Diät beziehungsweise OVX + Steroid nach zwölf Monaten Standzeit herabgesetzt wurde.

Die verminderte Differenzierungskapazität dieser MSC steht wiederum im Einklang mit ihrem Proliferationsvermögen, welches nach zwölf Monaten Standzeit nicht beeinträchtigt schien (Liu et al. 1999; Lecanda et al. 1997; Fromigue et al. 1998).

Ähnliche Erkenntnisse werden in weiteren Studien an MSC aus ovariectomierten Tiermodellen beschrieben, zum Beispiel zeigen MSC aus ovariectomierten Mäusen eine niedrigere Expression osteogener Marker im Vergleich zu Zellen der Kontroll-Gruppe (Zhou et al. 2001). In Studien von Torricelli et. al an MSC ovariectomierter Ratten und Schafe wurde eine verminderte osteogene Differenzierungskapazität dieser Zellen bei der Testung auf Biomaterialien festgestellt (Torricelli et al. 2000b; Torricelli et al. 2000a). Die Ratten dieser Studien wurden in einem Alter von zehn Monaten ovariectomiert und die Isolation der MSC erfolgte drei Monate nach der Operation (Torricelli et al. 2000b).

Eine Reduktion im osteogenen Differenzierungsvermögen wird auch als mögliche Folge der Alterung der MSC beschrieben. So zeigen MSC gealterter Ratten in verschiedenen Studien eine reduzierte osteogene Differenzierungskapazität (Wei et al. 2012; Asumda und Chase 2011).

5.5.3 Diskussion der Ergebnisse im Vergleich zu humanen MSC osteoporotischer Spender

Ziel der hier dargestellten Induktionsmethoden ist es, ein Modell für das Krankheitsbild der humanen Osteoporose in der Ratte zu etablieren, welches in der Lage ist, die Osteoporose möglichst genau zu imitieren. Ein Tiermodell ist jedoch in seinen Möglichkeiten limitiert und nie in der Lage eine Krankheit alle Aspekte betreffend widerzuspiegeln (Aerssens et al. 1998). Die ovariectomisierte Ratte ist das bislang am häufigsten studierte Tiermodell für Osteoporose (Egermann et al. 2005; Lelovas 2008), über das Verhalten der mesenchymalen Stammzellen ist bislang dennoch wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die MSC aus den unterschiedlichen Osteoporose-Modellen der Ratte zu charakterisieren und durch die gewonnenen Ergebnisse einen Vergleich zu humanen MSC osteoporotischer Spender zu ziehen.

Dieser Vergleich ist jedoch aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse der Studien an MSC osteoporotischer Spender schwierig. Die Ursachen für diese unterschiedlichen Ergebnisse sind unter Umständen zum Einen die verschiedenen Ausprägungen und Stadien der Osteoporose beim Menschen sowie zum Anderen starke inter-individuelle Schwankungen. Möglicherweise zeigen die MSC des Knochenmarks bei der Osteoporose des Menschen abhängig vom zeitlichen Verlauf der Erkrankung unterschiedliche Charakteristika, ähnlich wie es in der vorliegenden Arbeit bei unterschiedlichen Standzeiten der untersuchten Rattenmodelle gezeigt werden konnte.

So zeigen Genexpressionsanalysen an MSC osteoporotischer Spender Zeichen einer Präseneszenz, ein verringertes osteogenes Differenzierungsvermögen und auch eine verminderte Proliferationskapazität (Benisch et al. 2012). Korrespondierend hierzu beschreiben Studien von Rodriguez et. al eine verminderte osteogene Differenzierungskapazität, eine erhöhte adipogene Differenzierungskapazität sowie ein reduziertes Proliferationsvermögen der MSC osteoporotischer Spender (Rodriguez J.P. 2000; Rodriguez et al. 1999).

Justesen et. al konnten im Gegensatz dazu jedoch keine Veränderungen an MSC osteoporotischer Spender feststellen (Justesen J. 2002).

Daher ist es schwierig zu beurteilen, inwiefern die MSC aus den Osteoporose-Modellen der Ratte ein mit der Osteoporose des Menschen vergleichbares Verhalten zeigen. Im Falle der MSC nach drei Monaten Standzeit zeigen die MSC einen Phänotyp gealterter Stammzellen mit verminderter Proliferationskapazität und

einem Shift in die adipogene Linie. Diese Ergebnisse betrachtend ergeben sich Parallelen zu den Studien von Benisch und Rodriguez (Benisch et al. 2012; Rodriguez J.P. 2000; Rodriguez et al. 1999). Allerdings zeigten die MSC dieser Ratten ein sogar verstärktes osteogenes Differenzierungsvermögen.

Die MSC der Gruppen OVX + Diät und OVX + Steroid nach zwölf Monaten Standzeit wiesen ein im Vergleich zur Kontrolle vermindertes osteogenes Differenzierungsvermögen auf, wie es zum Teil auch bei MSC aus Osteoporose-Patienten nachgewiesen werden konnte (Rodriguez et al. 1999; Rodriguez J.P. 2000; Benisch et al. 2012). Allerdings zeigen die MSC nach zwölf Monaten Standzeit ein nicht beeinträchtigtes Proliferationsvermögen.

In einer Studie von Torricelli et. al wurden die Eigenschaften von MSC von Menschen, Ratten und Schafen miteinander verglichen, die größten Unterschiede fanden sich hier zwischen den MSC von Ratte und Mensch (Torricelli et al. 2003). Für weitere Untersuchungen in Tiermodellen ist es wichtig diese Differenzen zu kennen und näher zu bestimmen, um die gewonnenen Ergebnisse korrekt interpretieren zu können.

6 Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks aus Osteoporose-Modellen der Ratte.

Das Ziel dieser Arbeit war es, diese MSC näher zu charakterisieren und anhand der gewonnenen Ergebnisse die untersuchten Osteoporose-Modelle detaillierter zu beschreiben. Die untersuchten MSC entstammten aus Ratten des Teilprojektes T1 „Etablierung und Qualitätssicherung osteoporotischer Tiermodelle“ des Transregio 79 „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“. Diese Arbeit ist Bestandteil des Teilprojektes B4 „Einfluss mehrphasiger Knochenersatzstoffe und oberflächenmodifizierter Titanlegierungen auf die Differenzierung von Osteoblasten/MS“.

Untersucht wurden MSC aus den Modellen Ovariectomie in Kombination mit einer Calcium-defizitären Diät und Ovariectomie in Kombination mit der Gabe eines Steroids zu den Standzeiten drei und zwölf Monaten im Vergleich zu MSC scheinoperierter Kontroll-Ratten. Die Charakterisierung der isolierten MSC erfolgte hinsichtlich ihrer Morphologie, ihrer Proliferations- und Migrationskapazität sowie hinsichtlich ihres osteogenen und adipogenen Differenzierungsvermögens.

Folgende Erkenntnisse konnten aus den Untersuchungen gewonnen werden:

- Die Induktionsmethoden OVX + Diät und OVX + Steroid üben einen Einfluss auf die MSC des Knochenmarks aus, wobei sich die unterschiedlichen Kombinationen unterschiedlich stark auswirken. Durch die Kombination der Ovariectomie mit der Gabe einer Calcium-defizitären Diät konnten deutlichere Unterschiede zu MSC der Kontroll-Gruppe Sham gezeigt werden als durch die Kombination OVX + Steroid.
- Die Charakteristika der MSC ändern sich zudem im Laufe der Zeit, das heißt es zeigen sich gegensätzliche Ergebnisse bei Betrachtung der beiden Standzeiten drei und zwölf Monate.

Ein Vergleich der gewonnenen Ergebnisse des Tiermodells mit der Erkrankung Osteoporose gestaltet sich aufgrund widersprüchlicher Studien zu humanen MSC osteoporotischer Spender sowie der beschriebenen Limitationen des Tiermodells schwierig. Es konnten zum Teil, auch wiederum abhängig von der betrachteten Standzeit der Ratten, Parallelen zu Studien an humanen MSC festgestellt werden. Weitere Untersuchungen, sowohl an MSC aus Tiermodellen als auch an humanen MSC osteoporotischer Spender sind von Nöten, um die Differenzen zwischen Tiermodell und Mensch genau zu bestimmen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass, insbesondere durch die Induktionsmethode der Ovariectomie in Kombination mit einer Calciumdefizitären Diät die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks beeinflusst werden. Die MSC zeigen drei Monate nach Beginn der Induktion zunächst einen Phänotyp ähnlich gealterter Stammzellen. Zudem ist das Proliferations- und Migrationsvermögen der MSC vermindert. Die osteogene Differenzierungskapazität hingegen ist erhöht, was möglicherweise Ausdruck der Gegenregulation der MSC gegen den beginnenden Knochenmasseverlust darstellt. Diese Hypothese wird durch die signifikanten Unterschiede in der RUNX2 Expression undifferenzierter Zellen zwischen der Kontroll-Gruppe und der Gruppe OVX + Diät unterstützt ($p=0,0058$). Das Verhalten der MSC ändert sich mit andauernder Induktion. So zeigen die MSC der ovariectomierten Ratten nach zwölf Monaten Standzeit wiederum ein Proliferations- und Migrationsvermögen ähnlich dem der MSC aus Kontroll-Tieren. Das osteogene Differenzierungsvermögen ist nun hingegen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe Sham vermindert. Es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe OVX + Diät und der Gruppe Sham ($p=0,0468$) bezüglich der Osteocalcin-Expression der osteogen differenzierten Zellen. Nach zwölf Monaten Standzeit ist möglicherweise das osteogene Differenzierungsvermögen der MSC in gewisser Weise erschöpft.

7 Summary

The aim of this study was the characterization of bone-marrow derived mesenchymal stem cells in osteoporotic models of the rat.

To date the ovariectomized rat has been the most frequently used model of osteoporosis research. Since this disease occurs only in humans, there is a great need for valuable animal models to facilitate testing of new therapeutic approaches or new prosthetic devices for the osteoporotic bone. However, regarding characterization of bone-marrow derived MSC little information is available elucidating putative cellular changes in the course of osteoporosis induction in the rat model.

This work was part of the Collaborative Research Center Transregio 79 “Materials for tissue regeneration within systemically altered bone” sub-project B4 “Influence of multiphase-bone replacement materials and surface-modified titanium alloys on the differentiation of osteoblasts/MSCs”. The MSC studied were obtained of rats of the sub-project T1 “Establishment and quality management of osteoporotic animal models”.

Induction of osteoporosis in rats was performed by ovariectomy in combination with a calcium-deficient diet and by ovariectomy in combination with a steroid (dexamethasone). Three and twelve months after surgery, MSC were isolated from the bone marrow. Sham-operated groups were established as controls.

The harvested MSC were characterized regarding morphology, proliferation- and migration-capacity and their differentiation potential towards the adipogenic and osteogenic lineage.

Results indicate that induction of osteoporosis in the rat model by ovariectomy in combination with either a calcium-deficient diet or a steroid has an influence on the MSC residing in the bone marrow.

The MSC harvested three months after surgery showed a phenotype of cells in a state of presenescence. Proliferation- and migration rates were diminished pointing to self-renewal deficiency and impaired motility. However, osteogenic differentiation potential was increased after osteoporosis induction. These alterations compared to the control group Sham could be detected in both experimental groups (OVX + Diet and OVX + Steroid). However, the clearest differences

compared to the control group could be detected on MSC of the experimental group OVX + Diet.

In contrast, MSC harvested twelve months after surgery revealed no clear differences regarding proliferation and migration potential. However, the MSC of the experimental groups OVX + Diet and OVX + Steroid had a diminished osteogenic differentiation potential compared to the control group Sham.

Based on the present results, it could be shown that osteoporosis induction in the rat model affects the mesenchymal stem cells in the bone marrow. The characteristics of the MSC change dependent on the osteoporosis inducers administered.

Three months after surgery the osteogenic differentiation potential of the MSC of the experimental groups OVX + Diet and OVX + Steroid was increased.

Possibly, the up-regulation of osteogenic markers might represent a compensatory mechanism at the cellular level in consequence of the occurring bone loss. The significant differences in the expression of RUNX2 ($p = 0,0058$) between undifferentiated cells of the control group Sham and OVX + Diet support this hypothesis.

Twelve months after surgery, this compensation mechanism might be somehow exhausted since the osteogenic differentiation capacity of the MSC of the experimental groups OVX + Diet and OVX + Steroid was diminished compared to the control group Sham. The differences in the Osteocalcin expression of osteogenic differentiated cells between OVX + Diet and Sham were significant ($p = 0,0468$).

8 Literaturverzeichnis

- Aerssens, J.; Boonen, S.; Lowet, G.; Dequeker, J. (1998):** Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. In: *Endocrinology* 139 (2), S. 663–670.
- Anker, Pieterella S. in 't; Scherjon, Sicco A.; Kleijburg-van der Keur, Carin; Noort, Willy A.; Claas, Frans H. J.; Willemze, Roelof et al. (2003):** Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. In: *Blood* 102 (4), S. 1548–1549.
- Arai, F.; Miyamoto, T.; Ohneda, O.; Inada, T.; Sudo, T.; Brasel, K. et al. (1999):** Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. In: *J Exp Med* 190 (12), S. 1741–1754.
- Arnhold, Stefan J.; Goletz, Iris; Klein, Helmut; Stumpf, Gerald; Beluche, Lisa A.; Rohde, Carsten et al. (2007):** Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. In: *Am J Vet Res* 68 (10), S. 1095–1105.
- Arnhold, Stefan; Klein, Helmut; Klinz, Franz-Josef; Absenger, Yvonne; Schmidt, Annette; Schinkothe, Timo et al. (2006):** Human bone marrow stroma cells display certain neural characteristics and integrate in the subventricular compartment after injection into the liquor system. In: *Eur J Cell Biol* 85 (6), S. 551–565.
- Asumda, Faizal Z.; Chase, P. Bryant (2011):** Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. In: *BMC Cell Biol* 12 (1), S. 44.
- Barkhem, T.; Carlsson, B.; Nilsson, Y.; Enmark, E.; Gustafsson, J.; Nilsson, S. (1998):** Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. In: *Mol Pharmacol* 54 (1), S. 105–112.
- Bartholomew, Amelia; Sturgeon, Cord; Siatskas, Mandy; Ferrer, Karen; McIntosh, Kevin; Patil, Sheila et al. (2002):** Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. In: *Exp Hematol* 30 (1), S. 42–48.

- Battmann, A.; Schulz, A.; Stahl, U. (2001):** Cellular senescence: a mechanism in the development of osteoporosis? In: *Der Orthopäde* 30 (7), S. 405–411.
- Benisch, Peggy; Schilling, Tatjana; Klein-Hitpass, Ludger; Frey, Sonke P.; Seefried, Lothar; Raaijmakers, Nadja et al. (2012):** The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors. In: *PLoS One* 7 (9), S. e45142.
- Bennett, J. H.; Joyner, C. J.; Triffitt, J. T.; Owen, M. E. (1991):** Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. In: *J Cell Sci* 99 (Pt 1), S. 131–139.
- Bergman, R. J.; Gazit, D.; Kahn, A. J.; Gruber, H.; McDougall, S.; Hahn, T. J. (1996):** Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. In: *J Bone Miner Res* 11 (5), S. 568–577.
- Bonyadi, Mortaza; Waldman, Stephen D.; Liu, Danmei; Aubin (2003):** Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10), S. 5840–5845.
- Bouvard, Béatrice; Legrand, Erick; Audran, Maurice; Chappard, Daniel (2010):** Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: A Review. In: *Clinic Rev Bone Miner Metab* 8 (1), S. 15–26.
- Bucay, N.; Sarosi, I.; Dunstan, C. R.; Morony, S.; Tarpley, J.; Capparelli, C. et al. (1998):** Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. In: *Genes Dev.* 12 (9), S. 1260–1268.
- Campagnoli, C.; Roberts, I. A.; Kumar, S.; Bennett, P. R.; Bellantuono, I.; Fisk, N. M. (2001):** Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. In: *Blood* 98 (8), S. 2396–2402.
- Canalis, Ernesto; Bilezikian, John P.; Angeli, Alberto; Giustina, Andrea (2004):** Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. In: *Bone* 34 (4), S. 593–598.
- Caplan, A. I. (1991):** Mesenchymal stem cells. In: *J Orthop Res* 9 (5), S. 641–650.

- Castelo-Branco, Morgana T. L.; Soares, Igor D. P.; Lopes, Daiana V.; Buongusto, Fernanda; Martinusso, Cesonia A.; do Rosario, Alyson et al. (2012):** Intraperitoneal but Not Intravenous Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Home to the Inflamed Colon and Ameliorate Experimental Colitis. In: *PLoS ONE* 7 (3), S. e33360.
- Cerroni, A. M.; Tomlinson, G. A.; Turnquist, J. E.; Gryn timer, M. D. (2000):** Bone mineral density, osteopenia, and osteoporosis in the rhesus macaques of Cayo Santiago. In: *Am J Phys Anthropol* 113 (3), S. 389–410.
- Chamberlain, Giselle; Fox, James; Ashton, Brian; Middleton, Jim (2007):** Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. In: *Stem Cells* 25 (11), S. 2739–2749.
- Chanda, Diptiman; Kumar, Sanjay; Ponnazhagan, Selvarangan (2010):** Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. In: *J. Cell. Biochem.* 111 (2), S. 249–257.
- Chen, Jin-Ran; Plotkin, Lilian I.; Aguirre, Jose Ignacio; Han, Li; Jilka, Robert L.; Kousteni, Stavroula et al. (2005):** Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti-versus pro-apoptotic effects of estrogens. In: *J Biol Chem* 280 (6), S. 4632–4638.
- Collin, P.; Nefussi, J. R.; Wetterwald, A.; Nicolas, V.; Boy-Lefevre, M. L.; Fleisch, H.; Forest, N. (1992):** Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture. In: *Calcif Tissue Int* 50 (2), S. 175–183.
- Colter, D. C. (2001):** Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (14), S. 7841–7845.
- Compston, J. E. (2004):** The risks and benefits of HRT. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact* 4 (2), S. 187–190.
- Dachverband Osteologie e.V. (2009):** DVO guideline 2009 for Prevention, Diagnosis and Therapy of Osteoporosis in Adults. In: *Osteologie* 2011 (Vol 20 Issue 1 2011), S. 55–74.
- Delany, A. M.; Durant, D.; Canalis, E. (2001):** Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts. In: *Mol Endocrinol* 15 (10), S. 1781–1789.

- Deng, Zhong-Liang; Sharff, Katie A.; Tang, Ni; Song, Wen-Xin; Luo, Jin-yong; Luo, Xiaoji et al. (2008):** Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. In: *Front Biosci* 13, S. 2001–2021.
- Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; Ärzteblatt, Redaktion Deutsches: Deutsches Ärzteblatt (2006):** Versorgung von Osteoporose-Patienten in Deutschland: Ergebnisse der BoneEVA-Studie (29.09.2006).
- Dt. Aerzteblatt 2006; 103 (39): A-2542, B-2199, C-2120. Online verfügbar unter <http://www.aerzteblatt.de/archiv/52863/Versorgung-von-Osteoporose-Patienten-in-Deutschland-Ergebnisse-der-BoneEVA-Studie>, zuletzt geprüft am 09.09.2013.
- Di Nicola, Massimo; Carlo-Stella, Carmelo; Magni, Michele; Milanesi, Marco; Longoni, Paolo D.; Matteucci, Paola et al. (2002):** Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. In: *Blood* 99 (10), S. 3838–3843.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, Fc; Krause, Ds et al. (2006):** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–317.
- Dore, R. K. (2010):** How to prevent glucocorticoid-induced osteoporosis. In: *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 77 (8), S. 529–536.
- Dougall, W. C.; Glaccum, M.; Charrier, K.; Rohrbach, K.; Brasel, K.; Smedt, T. de et al. (1999):** RANK is essential for osteoclast and lymph node development. In: *Genes Dev* 13 (18), S. 2412–2424.
- Dziedziejko, Violetta; Safranow, Krzysztof; Slowik-Zylka, Dorota; Machoy-Mokrzynska, Anna; Millo, Barbara; Machoy, Zygmunt; Chlubek, Dariusz (2009):** Characterisation of rat and human tissue alkaline phosphatase isoforms by high-performance liquid chromatography and agarose gel electrophoresis. In: *Biochimie* 91 (3), S. 445–452.
- Egermann, Marcus; Goldhahn, J.; Schneider, E. (2005):** Animal models for fracture treatment in osteoporosis. In: *Osteoporos Int* 16 Suppl 2, S. S129–38.
- Ernst, M.; Heath, J. K.; Rodan, G. A. (1989):** Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. In: *Endocrinology* 125 (2), S. 825–833.

- European foundation for osteoporosis (1991):** Consensus development conference: Prophylaxis and treatment of osteoporosis. In: *Osteoporosis Int* (1), S. 114–117.
- Fini, M.; Torricelli, P.; Giavaresi, G.; Carpi, A.; Nicolini, A.; Giardino, R. (2001):** Effect of L-lysine and L-arginine on primary osteoblast cultures from normal and osteopenic rats. In: *Biomed Pharmacother* 55 (4), S. 213–220.
- Food and Drug Administration Division of metabolism and Endocrine Drug Products (1994):** Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Hg. v. Food and Drug Administration Division of metabolism and Endocrine Drug Products. Online verfügbar unter <http://www.fda.gov/downloads/scienceresearch/specialtopics/womenshealthresearch/ucm131206.pdf>, zuletzt geprüft am 08.09.2013.
- Forbes, A. P. (1991):** Fuller Albright. His concept of postmenopausal osteoporosis and what came of it. In: *Clin Orthop Relat Res* (269), S. 128–141.
- Friedenstein, A. J.; Gorskaja, J. F.; Kulagina, N. N. (1976):** Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. In: *Exp Hematol* 4 (5), S. 267–274.
- Friedenstein, A. J.; Petrakova, K. V.; Kurolesova, A. I.; Frolova, G. P. (1968):** Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. In: *Transplantation* 6 (2), S. 230–247.
- Frisch, R. E.; Canick, J. A.; Tulchinsky, D. (1980):** Human fatty marrow aromatizes androgen to estrogen. In: *J Clin Endocrinol Metab* 51 (2), S. 394–396.
- Fromigue, O.; Marie, P. J.; Lomri, A. (1998):** Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. In: *J Cell Biochem* 68 (4), S. 411–426.
- Frost H.M.; Jee W.S.S (1992):** On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. In: *Bone and Mineral* (18), S. 227–236.
- Frost, H. M. (1997):** Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm). In: *Bone* 20 (5), S. 385–391.
- Fujita, T. (2004):** Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. In: *The Journal of Cell Biology* 166 (1), S. 85–95.

- Gallagher, J. C. (1990):** The pathogenesis of osteoporosis. In: *Bone Miner* 9 (3), S. 215–227.
- Ganss, B.; Kim, R. H.; Sodek, J. (1999):** Bone sialoprotein. In: *Crit Rev Oral Biol Med* 10 (1), S. 79–98.
- Garcia Palacios, V. (2005):** Negative Regulation of RANKL-induced Osteoclastic Differentiation in RAW264.7 Cells by Estrogen and Phytoestrogens. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (14), S. 13720–13727.
- Gimble, J. M.; Robinson, C. E.; Wu, X.; Kelly, K. A. (1996):** The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. In: *Bone* 19 (5), S. 421–428.
- Häussler, B.; Gothe, H.; Göl, D.; Glaeske, G.; Pientka, L.; Felsenberg, D. (2007):** Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany—the BoneEVA Study. In: *Osteoporos Int* 18 (1), S. 77–84.
- Heiss, Christian; Govindarajan, Parameswari; Schlewitz, Gudrun; Hemdan, Nasr Y. A.; Schlieffe, Nathalie; Alt, Volker et al. (2012):** Induction of osteoporosis with its influence on osteoporotic determinants and their interrelationships in rats by DEXA. In: *Med Sci Monit* 18 (6), S. BR199-207.
- Hofbauer, L. C.; Gori, F.; Riggs, B. L.; Lacey, D. L.; Dunstan, C. R.; Spelsberg, T. C.; Khosla, S. (1999a):** Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. In: *Endocrinology* 140 (10), S. 4382–4389.
- Hofbauer, L. C.; Khosla, S.; Dunstan, C. R.; Lacey, D. L.; Spelsberg, T. C.; Riggs, B. L. (1999b):** Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. In: *Endocrinology* 140 (9), S. 4367–4370.
- Hofmann, A.; Mattyasovszky, S.G; Brüning, C.; Ritz, U.; Mehling, I.; Meurer, A.; Rommens, P.M (2009):** Osteoblasten. In: *Orthopäde* 38 (11), S. 1009–1019.
- Hughes, D. E.; Dai, A.; Tiffée, J. C.; Li, H. H.; Mundy, G. R.; Boyce, B. F. (1996):** Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. In: *Nat Med* 2 (10), S. 1132–1136.
- Ichioka, Naoya; Inaba, Muneo; Kushida, Taketohi; Esumi, Takashi; Takahara, Kazuhiko; Inaba, Kayo et al. (2002):** Prevention of senile osteoporosis

- in SAMP6 mice by intrabone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. In: *Stem Cells* 20 (6), S. 542–551.
- Jee W.S.S.; Yao W. (2001):** Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. In: *J Musculoskel Neuron Interact* (1(3)), S. 193–207.
- Jilka, R. L.; Weinstein, R. S.; Takahashi, K.; Parfitt, A. M.; Manolagas, S. C. (1996):** Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. In: *J. Clin. Invest.* 97 (7), S. 1732–1740.
- Johnell, O.; Kanis, J. A. (2006):** An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. In: *Osteoporos Int* 17 (12), S. 1726–1733.
- Justesen, J.; Stenderup, K.; Eriksen, EF.; Kassem, M. (2002):** Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. In: *Calcif Tissue Int.* (71(1)), S. 36–44.
- Kajkenova, O.; Lecka-Czernik, B.; Gubrij, I.; Hauser, S. P.; Takahashi, K.; Parfitt, A. M. et al. (1997):** Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia. In: *J Bone Miner Res* 12 (11), S. 1772–1779.
- Kalu, Dike N. (1991):** The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. In: *Bone and Mineral* 15 (3), S. 175–191.
- Kanis, J. A.; Burlet, N.; Cooper, C.; Delmas, P. D.; Reginster, J-Y; Borgstrom, F.; Rizzoli, R. (2008):** European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. In: *Osteoporos Int* 19 (4), S. 399–428.
- Karsenty, G. (2000):** Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. In: *Semin Cell Dev Biol* 11 (5), S. 343–346.
- Kassem, M.; Ankersen, L.; Eriksen, E. F.; Clark, B. F.; Rattan, S. I. (1997):** Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts. In: *Osteoporos Int* 7 (6), S. 514–524.
- Komori, Toshihisa (2006):** Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. In: *J Cell Biochem* 99 (5), S. 1233–1239.
- Koshihara, Moyuru; Masuyama, Ritsuko; Uehara, Mariko; Suzuki, Kazuharu (2004):** Effect of dietary calcium: Phosphorus ratio on bone miner-

- alization and intestinal calcium absorption in ovariectomized rats. In: *Biofactors* 22 (1-4), S. 39–42.
- Kousteni, S. (2003):** Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. In: *Journal of Clinical Investigation* 111 (>11), S. 1651–1664.
- Lecanda, F.; Avioli, L. V.; Cheng, S. L. (1997):** Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. In: *J Cell Biochem* 67 (3), S. 386–396.
- Lelovas, Pavlos P. (2008):** The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. In: *Comparative Medicine* 58(5), S. 424–430.
- Lerner, U. H. (2006):** Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. In: *J Dent Res* 85 (7), S. 584–595.
- Lill, C. A.; Gerlach, U. V.; Eckhardt, C.; Goldhahn, J.; Schneider, E. (2002):** Bone Changes due to Glucocorticoid Application in an Ovariectomized Animal Model for Fracture Treatment in Osteoporosis. In: *Osteoporosis International* 13 (5), S. 407–414.
- Liu, P.; Oyajobi, B. O.; Russell, R. G. G.; Scutt, A. (1999):** Regulation of Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells: Interaction Between Transforming Growth Factor- β and 1,25(OH) $_2$ Vitamin D $_3$ In Vitro. In: *Calcified Tissue International* 65 (2), S. 173–180.
- Magnusson, P.; Larsson, L.; Englund, G.; Larsson, B.; Strang, P.; Selin-Sjogren, L. (1998):** Differences of bone alkaline phosphatase isoforms in metastatic bone disease and discrepant effects of clodronate on different skeletal sites indicated by the location of pain. In: *Clin Chem* 44 (8 Pt 1), S. 1621–1628.
- Manolagas, S. C. (2000a):** Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. In: *Endocr Rev* 21 (2), S. 115–137.
- Manolagas, S. C.; Weinstein, R. S. (1999):** New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. In: *J. Bone Miner. Res.* 14 (7), S. 1061–1066.
- Manolagas, Stavros C. (2000b):** Corticosteroids and Fractures: A Close Encounter of the Third Cell Kind. In: *J Bone Miner Res* 15 (6), S. 1001–1005.

- Martin, R. B.; Zissimos, S. L. (1991):** Relationships between marrow fat and bone turnover in ovariectomized and intact rats. In: *Bone* 12 (2), S. 123–131.
- McCann, Roseleen M.; Colleary, Gary; Geddis, Carolyn; Clarke, Susan A.; Jordan, Grant R.; Dickson, Glenn R.; Marsh, David (2008):** Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. In: *J. Orthop. Res.* 26 (3), S. 384–393.
- Moroni, Lorenzo; Fornasari, Pier Maria (2012):** Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization, and differentiation potential of alternative stem cell sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. In: *J. Cell. Physiol.*, 228 (4), S. 680–687.
- Nakahara, H.; Dennis, J. E.; Bruder, S. P.; Haynesworth, S. E.; Lennon, D. P.; Caplan, A. I. (1991):** In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. In: *Exp Cell Res* 195 (2), S. 492–503.
- Nitta, T.; Fukushima, T.; Nakamuta, H.; Koida, M. (1999):** Glucocorticoid-induced secondary osteopenia in female rats: a time course study as compared with ovariectomy-induced osteopenia and response to salmon calcitonin. In: *Jpn J Pharmacol* 79 (3), S. 379–386.
- Nuttall, M. E.; Patton, A. J.; Olivera, D. L.; Nadeau, D. P.; Gowen, M. (1998):** Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. In: *J Bone Miner Res* 13 (3), S. 371–382.
- Ophoff, Jill; Vanderschueren, Dirk (2005):** The senile osteoporosis mouse model SAMP-6: The ideal animal model for human osteoporosis? In: *IBMS BoneKEy* 2 (5), S. 26–34.
- Parekkadan, Biju; Milwid, Jack M. (2010):** Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. In: *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 12 (1), S. 87–117.
- Pereira, R. C.; Delany, A. M.; Canalis, Ernesto (2002):** Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. In: *Bone* 30 (5), S. 685–691.
- Pfeilschifter, J. (2002):** Changes in Proinflammatory Cytokine Activity after Menopause. In: *Endocrine Reviews* 23 (1), S. 90–119.
- Phimphilai, Mattabhorn; Zhao, Zhouran; Boules, Heidi; Roca, Hernan; Franceschi, Renny T. (2006):** BMP Signaling Is Required for RUNX2-

Dependent Induction of the Osteoblast Phenotype. In: *J Bone Miner Res* 21 (4), S. 637–646.

Pivonka, Peter; Zimak, Jan; Smith, David W.; Gardiner, Bruce S.; Dunstan, Colin R.; Sims, Natalie A. et al. (2008): Model structure and control of bone remodeling: A theoretical study. In: *Bone* 43 (2), S. 249–263.

Rastegar, Farbod; Shenaq, Deana; Huang, Jiayi; Zhang, Wenli; Zhang, Bing-Qiang; He, Bai-Cheng et al. (2010): Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. In: *World J Stem Cells* 2 (4), S. 67–80.

Robert Koch-Institut, Berlin (Hg.) (2012): Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2010". Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Unter Mitarbeit von Thomas Ziese Cornelia Lange. S.113-115, Online verfügbar unter http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/remDCCtjOJxI/PDF/21TgKGZEOWNCY.pdf, zuletzt geprüft am 08.09.2013.

Rodriguez, J.P.; Montecinos, L.; Rios, S.; Reyes, P.; Martinez, J. (2000): Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. In: *Journal of Cellular Biochemistry* (79), S. 557–565.

Rodriguez, J. P.; Garat, S.; Gajardo, H.; Pino, A. M.; Seitz, G. (1999): Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. In: *J Cell Biochem* 75 (3), S. 414–423.

Rosland, Gro Vatne; Svendsen, Agnete; Torsvik, Anja; Sobala, Ewa; McCormack, Emmet; Immervoll, Heike et al. (2009): Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. In: *Cancer Res* 69 (13), S. 5331–5339.

Rubin, J.; Biskobing, D. M.; Jadhav, L.; Fan, D.; Nanes, M. S.; Perkins, S.; Fan, X. (1998): Dexamethasone promotes expression of membrane-bound macrophage colony-stimulating factor in murine osteoblast-like cells. In: *Endocrinology* 139 (3), S. 1006–1012.

Sawako, Tatsumi; Kiyoaki, Ishii; Norio, Amizuka; Minqi, Li; Toshihiro, Kobayashi; Kenji, Kohno (2007): Targeted Ablation of Osteocytes Induces

- Osteoporosis with Defective Mechanotransduction. In: *Cell Metabolism* (Volume 5), S. 464–475.
- Schuiling, Kerri Durnell; Robinia, Kristi; Nye, Rachel (2011):** Osteoporosis update. In: *J Midwifery Womens Health* 56 (6), S. 615–627.
- Shell, Katja; Raabe, Oksana; Freitag, Christian; Ohrndorf, Arne; Christ, Hans-Jürgen; Wenisch, Sabine; Arnhold, Stefan (2012):** Comparison of Equine Adipose Tissue-Derived Stem Cell Behavior and Differentiation Potential Under the Influence of 3% and 21% Oxygen Tension. In: *Journal of Equine Veterinary Science* 33 (2), S. 74–82.
- Shen, V.; Birchman, R.; Liang, X. G.; Wu, D. D.; Lindsay, R.; Dempster, D. W. (1997):** Prednisolone alone, or in combination with estrogen or dietary calcium deficiency or immobilization, inhibits bone formation but does not induce bone loss in mature rats. In: *Bone* 21 (4), S. 345–351.
- Shi, Yufang; Su, Juanjuan; Roberts, Arthur I.; Shou, Peishun; Rabson, Arnold B.; Ren, Guangwen (2012):** How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. In: *Trends in Immunology* 33 (3), S. 136–143.
- Simonet, W.S.; Lacey, D.L.; Dunstan, C.R.; Kelley, M.; Chang, M.-S.; Lüthy, R. et al. (1997):** Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. In: *Cell* 89 (2), S. 309–319.
- Sims, Natalie A.; Gooi, Jonathan H. (2008):** Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. In: *Semin Cell Dev Biol* 19 (5), S. 444–451.
- Srivastava, S. (2000):** Estrogen Decreases Osteoclast Formation by Down-regulating Receptor Activator of NF-kappa B Ligand (RANKL)-induced JNK Activation. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (12), S. 8836–8840.
- Stenderup, Karin; Justesen, Jeannette; Clausen, Christian; Kassem, Moustapha (2003):** Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. In: *Bone* 33 (6), S. 919–926.
- Stenderup, Karin; Justesen, Jeannette; Eriksen, Erik F.; Rattan, Suresh I. S.; Kassem, Moustapha (2001):** Number and Proliferative Capacity of Osteogenic Stem Cells Are Maintained During Aging and in Patients with Osteoporosis. In: *J Bone Miner Res* 16 (6), S. 1120–1129.

- Suda, T.; Takahashi, N.; Udagawa, N.; Jimi, E.; Gillespie, M. T.; Martin, T. J. (1999):** Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. In: *Endocr Rev* 20 (3), S. 345–357.
- Taranta, A.; Brama, M.; Teti, A.; luca, V. de; Scandurra, R.; Spera, G. et al. (2002):** The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro. In: *Bone* 30 (2), S. 368–376.
- Teven, Chad M.; Liu, Xing; Hu, Ning; Tang, Ni; Kim, Stephanie H.; Huang, Enyi et al. (2011):** Epigenetic Regulation of Mesenchymal Stem Cells: A Focus on Osteogenic and Adipogenic Differentiation. In: *Stem Cells International* 2011, S. 1–18.
- Thompson, D. D.; Simmons, H. A.; Pirie, C. M.; Ke, H. Z. (1995):** FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. In: *Bone* 17 (4 Suppl), S. 125S–133S.
- Torricelli, P.; Fini, M.; Giavaresi, G.; Rocca, M.; Pierini, G.; Giardino, R. (2000a):** Isolation and characterization of osteoblast cultures from normal and osteopenic sheep for biomaterials evaluation. In: *J Biomed Mater Res* 52 (1), S. 177–182.
- Torricelli, P.; Fini, M.; Rocca, M.; Giavaresi, G.; Giardino, R. (2000b):** In vitro pathological model of osteopenia to test orthopaedic biomaterials. In: *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 28 (2), S. 181–192.
- Torricelli, Paola; Fini, Milena; Giavaresi, Gianluca; Giardino, Roberto (2003):** Osteoblasts cultured from osteoporotic bone: a comparative investigation on human and animal-derived cells. In: *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 31 (3), S. 263–277.
- Tuli, R.; Tuli, S.; Nandi, S.; Wang, M.L.; Alexander, P.G.; Haleem-Smith, H.; Hozack, W.J.; Manner, P.A.; Danielson, K.G.; Tuan, R.S (2003):** Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. In: *Stem Cells* (21), S. 681–693.
- Turner, A. Simon (2001):** Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. In: *Eur Cell Mater* (1), S. 66–81.
- Uccelli, Antonio; Moretta, Lorenzo; Pistoia, Vito (2008):** Mesenchymal stem cells in health and disease. In: *Nat Rev Immunol* 8 (9), S. 726–736.
- van Wesenbeeck, L. (2002):** The osteopetrotic mutation toothless (tl) is a loss-of-function frameshift mutation in the rat *Csf1* gene: Evidence of a crucial role for

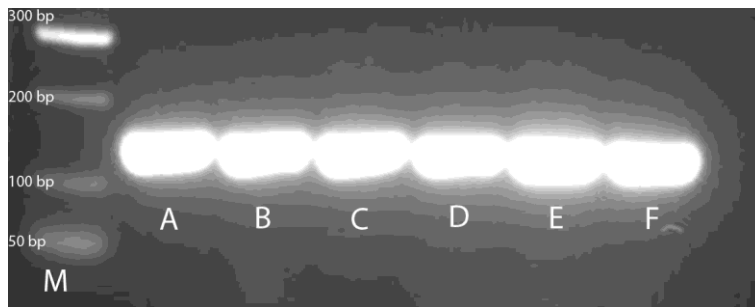
- CSF-1 in osteoclastogenesis and endochondral ossification. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (22), S. 14303–14308.
- Wakitani, S.; Saito, T.; Caplan, A. I. (1995):** Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. In: *Muscle Nerve* 18 (12), S. 1417–1426.
- Ward, Kenneth D.; Klesges, Robert C. (2001):** A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. In: *Calcif Tissue Int* 68 (5), S. 259–270.
- Wei, Na; Yu, Yang; Schmidt, Thomas; Stanford, Clark; Hong, Liu (2012):** Effects of glucocorticoid receptor antagonist, RU486, on the proliferative and differentiation capabilities of bone marrow mesenchymal stromal cells in ovariectomized rats. In: *J Orthop Res* 31 (5), S. 760-767.
- Weinstein, R. S.; Jilka, R. L.; Parfitt, A. M.; Manolagas, S. C. (1998):** Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. In: *J. Clin. Invest.* 102 (2), S. 274–282.
- Weitzmann, M. N. (2006):** Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. In: *Journal of Clinical Investigation* 116 (5), S. 1186–1194.
- Weitzmann, M. Neale; Roggia, Cristiana; Toraldo, Gianluca; Weitzmann, Louise; Pacifici, Roberto (2002):** Increased production of IL-7 uncouples bone formation from bone resorption during estrogen deficiency. In: *J Clin Invest* 110 (11), S. 1643–1650.
- Wenisch, Sabine; Trinkaus, Katja; Hild, Anne; Hose, Dirk; Herde, Katja; Heiss, Christian et al. (2005):** Human reaming debris: a source of multipotent stem cells. In: *Bone* 36 (1), S. 74–83.
- Wilson, Amber; Shehadeh, Lina A.; Yu, Hong; Webster, Keith A. (2010):** Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. In: *BMC Genomics* 11 (1), S. 229.
- Woodbury, D.; Schwarz, E. J.; Prockop, D. J.; Black, I. B. (2000):** Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. In: *J Neurosci Res* 61 (4), S. 364–370.
- Wronski, T. J.; Dann, L. M.; Scott, K. S.; Cintron, M. (1989):** Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. In: *Calcif Tissue Int* 45 (6), S. 360–366.

- Yao, Wei; Cheng, Zhiqiang; Busse, Cheryl; Pham, Aaron; Nakamura, Mary C.; Lane, Nancy E. (2008):** Glucocorticoid excess in mice results in early activation of osteoclastogenesis and adipogenesis and prolonged suppression of osteogenesis: a longitudinal study of gene expression in bone tissue from glucocorticoid-treated mice. In: *Arthritis Rheum.* 58 (6), S. 1674–1686.
- Yue, B.; Lu, B.; Dai, K. R.; Zhang, X. L.; Yu, C. F.; Lou, J. R.; Tang, T. T. (2005):** BMP2 gene therapy on the repair of bone defects of aged rats. In: *Calcif Tissue Int* 77 (6), S. 395–403.
- Zhou, S.; Zilberman, Y.; Wassermann, K.; Bain, S. D.; Sadovsky, Y.; Gazit, D. (2001):** Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. In: *J Cell Biochem Suppl* 36, S. 144–155.
- Zuk, Patricia A.; Zhu, Min; Ashjian, Peter; Ugarte, Daniel A. de; Huang, Jerry I.; Mizuno, Hiroshi et al. (2002):** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. In: *Mol Biol Cell* 13 (12), S. 4279–4295.

9 Anhang

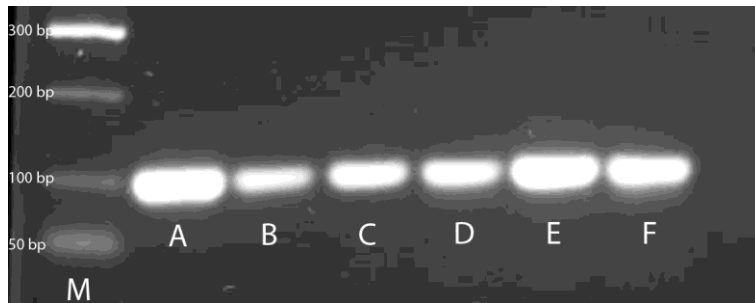
9.1 Überprüfung des PCR Produktes in der Agar Gelelektrophorese

Abbildung 23: PCR-Produkte *Gapdh*, *ALP*, *BSP*, *OC*, *RUNX2*



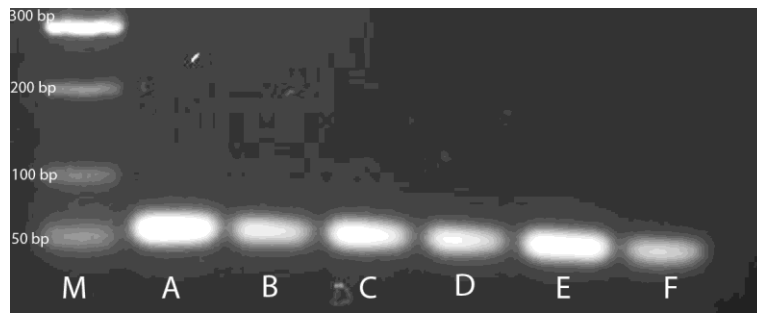
Gapdh, Produktgröße 149 bp

(A) Sham, Standzeit 3 Monate; (B) Sham, Standzeit 12 Monate; (C) OVX + Diät, Standzeit 3 Monate; (D) OVX + Diät, Standzeit 12 Monate; (E) OVX + Steroid, Standzeit 3 Monate; (F) OVX + Steroid, Standzeit 12 Monate; (M) Marker



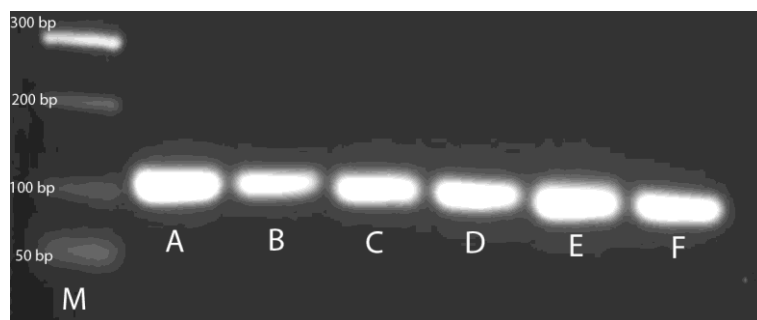
ALP, Produktgröße 102 bp

(A) Sham, Standzeit 3 Monate; (B) Sham, Standzeit 12 Monate; (C) OVX + Diät, Standzeit 3 Monate; (D) OVX + Diät, Standzeit 12 Monate; (E) OVX + Steroid, Standzeit 3 Monate; (F) OVX + Steroid, Standzeit 12 Monate; (M) Marker



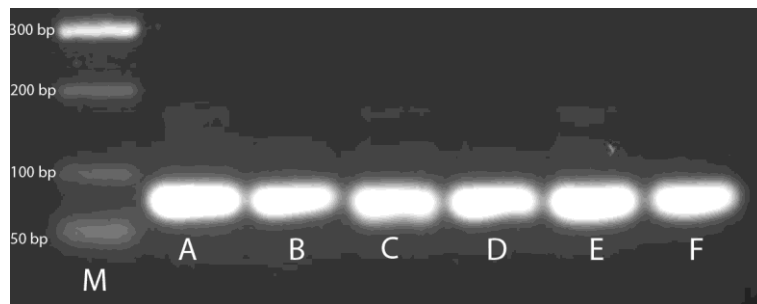
BSP, Produktgröße 61 bp

(A) Sham, Standzeit 3 Monate; (B) Sham, Standzeit 12 Monate; (C) OVX + Diät, Standzeit 3 Monate; (D) OVX + Diät, Standzeit 12 Monate; (E) OVX + Steroid, Standzeit 3 Monate; (F) OVX + Steroid, Standzeit 12 Monate; (M) Marker



OC, Produktgröße 113 bp

(A) Sham, Standzeit 3 Monate; (B) Sham, Standzeit 12 Monate; (C) OVX + Diät, Standzeit 3 Monate; (D) OVX + Diät, Standzeit 12 Monate; (E) OVX + Steroid, Standzeit 3 Monate; (F) OVX + Steroid, Standzeit 12 Monate; (M) Marker



RUNX2, Produktgröße 84 bp

(A) Sham, Standzeit 3 Monate; (B) Sham, Standzeit 12 Monate; (C) OVX + Diät, Standzeit 3 Monate; (D) OVX + Diät, Standzeit 12 Monate; (E) OVX + Steroid, Standzeit 3 Monate; (F) OVX + Steroid, Standzeit 12 Monate; (M) Marker

9.2 Publikationen

Diese Dissertation wurde in Teilen in folgender Publikation veröffentlicht:

Characterization of Bone-Marrow-Derived Stem Cells in Osteoporotic Models of the Rat

Julia Goergen, Sabine Wenisch, Oksana Raabe, Andreas Moritz, Gudrun Schlwitz, Reinhard Schnettler, Ute Hempel, Christian Heiß, Stefan Arnhold.

ISRN Stem Cells

Volume 2013 (2013), Article ID 262451, 9 pages

<http://dx.doi.org/10.1155/2013/262451>

Posterpräsentationen:

Short term characterisation of mesenchymal stem cells derived from two rat osteoporosis models

Julia Goergen, Ute Hempel, Oksana Raabe, Christian Heiß, Sabine Wenisch, Stefan Arnhold;

29. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg 2012

Vergleichende Untersuchungen zur Stammzellcharakterisierung und zum Knochenstoffwechsel in Osteoporosemodellen der Ratte

Julia Goergen, Ute Hempel, Oksana Raabe, Christian Heiß, Sabine Wenisch, Stefan Arnhold;

28. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg 2011

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Julia Goergen

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold und bei Frau Prof. Dr. Sabine Wenisch für die Überlassung des interessanten Themas, das entgegengebrachte Vertrauen, die gute Betreuung und Ihre freundschaftliche und aufmunternde Unterstützung in allen Phasen der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Danken möchte ich der DFG für finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung der Sachmittel im Rahmen der Forschergruppe SFB/Transregio 79.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Mitarbeiter des Instituts für die tolle Arbeitsatmosphäre und eure Unterstützung. Es war eine schöne Zeit!

Insbesondere möchte ich Dr. Oksana Raabe danken für Ihr immer offenes Ohr und Ihre kompetente Unterstützung in der Versuchsplanung und Durchführung sowie für Ihre schnellen und hilfreichen Korrekturen; Annika Gössl, Carina Crispens und Lena Kaiser danke ich für die Einarbeitung und Hilfe in der Zellkultur sowie die schönen Gespräche, die die zum Teil langwierigen Arbeiten im Zellkulturlabor ganz kurzweilig gemacht haben; vielen Dank auch an Dr. Daniela Fietz nicht nur für Ihre Hilfe in Fragen zur qPCR; großer Dank geht an Anne Hild, die mir unermüdlich in allen Laborfragen zur Seite stand und Ihre großartige, geduldige Hilfe in der Erstellung der Bilder und Graphiken; danken möchte ich auch meinen Zimmerkollegen und Mit-Doktoranden Dr. Kristina Glenske, Bastian Krähling, Christine, Katja, Eva, Roman, Alena, Nadine und Julia für die gegenseitige Unterstützung und Hilfestellung, sowie viele tolle Gespräche und schöne Stunden in Büro und Labor.

Mein Dank gilt auch dem Zentrallabor der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Calcium-Messung meiner vielen Proben im oft ohnehin stressigen und arbeitsreichen Kliniksalltag.

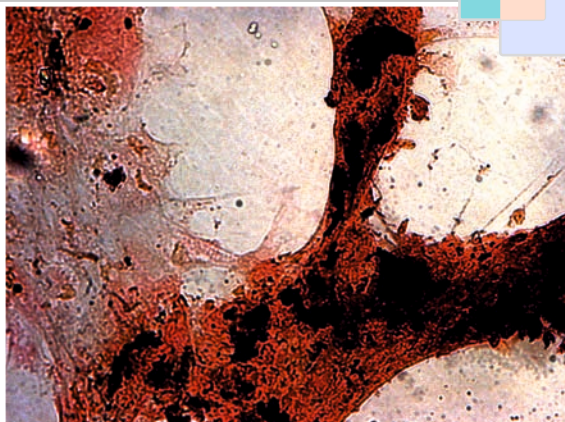
Herrn Dr. rer. nat. Klaus Failing, Herrn Andreas Schaubmar und Frau Marion Sparenberg der Arbeitsgruppe für Biomathematik und Datenverarbeitung des

Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität danke ich für die statistische Auswertung meiner Daten und deren gute Betreuung in statistischen Fragen.

Zuletzt geht mein größter Dank an meine Familie und Freunde!

Ich danke meinem Freund Alex für sein Verständnis, seine liebevolle Geduld und Unterstützung in Rat und Tat, insbesondere in Kämpfen mit dem Computer.

Großer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, die mir das Studium und die Promotion erst ermöglicht haben und mich immer in meinen Wünschen und Träumen unterstützen!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6157-9



9 783835 196157 9